

COENZYM-SPEZIFITÄT UND SUBSTRAT-SPEZIFITÄT BEI
ENZYMATISCHEN REDOXREAKTIONEN IN DER LEBERZELLE UNTER
BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DES WASSERSTOFF-TRANSFERS
ZWISCHEN STEROIDEN

Inaugural-Dissertation
vorgelegt
beim
Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik
der
FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN
zur Erlangung der Würde eines
DOCTOR RERUM NATURALIUM

von
Lutz Pitzel
aus Pernitz

1971

COENZYM-SPEZIFITÄT UND SUBSTRAT-SPEZIFITÄT BEI
ENZYMATISCHEN REDOXREAKTIONEN IN DER LEBERZELLE UNTER
BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DES WASSERSTOFF-TRANSFERS
ZWISCHEN STEROIDEN

Inaugural-Dissertation

vorgelegt

beim

Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik

der

FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

zur Erlangung der Würde eines

DOCTOR RERUM NATURALIUM

von

Lutz Pitzel

aus Pernitz



1. Gutachter : Prof. Dr. M. Wenzel

2. Gutachter : Prof. Dr. P. Schmialek

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juni 1971

Tag der Promotion :

Die Arbeit wurde im Pharmazeutischen
Institut der Freien Universität Ber-
lin unter Leitung von Herrn Prof. Dr.
M. W e n z e l ausgeführt, dem ich
hiermit für die bei der Durchführung
der Arbeit erhaltenen wertvollen
Anregungen herzlich danke.

Der Firma Schering AG, Berlin danke
ich für die Überlassung von Steroid-
Verbindungen.

INHALT

	Seite
EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1 - 3
BEDEUTUNG DER PYRIDINNUCLEOTIDE	4 - 8
WASSERSTOFF-TRANSFER VON TRITIERTEN VERBINDUNGEN AUF PYRIDINNUCLEOTIDE	9 - 27
Darstellung der Versuchsergebnisse	9 - 19
Diskussion: "Die Coenzym-Spezifität ver- schiedener Dehydrogenasen"	19 - 27
WASSERSTOFF-TRANSFER ÜBER PYRIDINNUCLEOTIDE AUF STEROIDE	28 - 67
Spezifität des Wasserstoffs ver- schiedener Donatoren bei der Re- duktion der 17-Keto-Gruppe von Steroiden	32 - 34
Spezifität des Wasserstoffs ver- schiedener Donatoren bei der Re- duktion der 3-Keto-Gruppe von Steroiden	34 - 37
Spezifität des Wasserstoffs ver- schiedener Donatoren bei der Re- duktion der Δ_4 -Doppelbindung von Steroiden	37 - 40

Diskussion der Versuchsergebnisse	40 - 52
Wasserstoff-Transfer auf Position	
C ₁₇	40 - 42
Wasserstoff-Transfer auf Position	
C ₃	42 - 49
Wasserstoff-Transfer auf die	
Δ_4 -Doppelbindung	50 - 52
Untersuchungen an 5 α -Androstandion-	
4,5,6-T	57 - 67
Darstellung der Versuchsergebnisse	57 - 65
Diskussion der Versuchsergebnisse	65 - 67
ZUSAMMENFASSUNG	68 - 71
LITERATUR	72 - 74
METHODIK	M 1 - M ₂₉
Radiochemisch-präparativer Teil	M 1-M ₂₁
Synthese von 5 α -Androstan-3 β -ol-	
17-on-3 α -T	M 1-M ₁₁
Synthese von Δ_4 -Pregnen-20 β -ol-	
3-on-20 α -T	M ₁₁ -M ₁₆
Synthese von 5 α -Dihydrotestoste-	
ron-4,5,6-T	M ₁₇ -M ₂₁
Biochemischer Teil	M ₂₁ -M ₂₆
Physikalisch-chemische Methoden	M ₂₆ -M ₂₈
Material	M ₂₉

EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Stoffwechselvorgänge verlaufen über eine Vielzahl miteinander gekoppelter Wege, teilweise auch über Kreisprozesse. Die Schwierigkeit von Stoffwechsel-Untersuchungen wird durch die Strukturierung der Zelle zusätzlich erhöht, da viele Prozesse nur in ganz bestimmten Bezirken der Zelle ablaufen.

Wir haben unsere Untersuchungen überwiegend auf ein Organ des Organismus - die Leber - beschränkt. Sie nimmt durch ihre große Anzahl enzymatischer Abbaumöglichkeiten eine zentrale Stellung im Zwischenstoffwechsel ein; auch ist die Aktivität ihrer Enzymstrukturen recht groß.

Zudem haben wir für unsere Untersuchungen radioaktiv markierte Substrate verwendet. Der Vorteil ihrer Anwendung liegt einmal in der hohen Empfindlichkeit ihres Nachweises, zum anderen aufgrund dieser Nachweismöglichkeiten in der Anwendung so geringer Mengen an Testsubstanzen, daß im physiologischen Bereich gearbeitet werden kann.

Von Interesse war bei unseren Untersuchungen der Stoffwechsel des Wasserstoffs. Dieser durch enzymatische Reaktionen gesteuerte Wasserstoff-Transport innerhalb der Zelle ist deshalb von Bedeutung, weil

- a) reduktive Synthesen durch ihn ermöglicht werden,

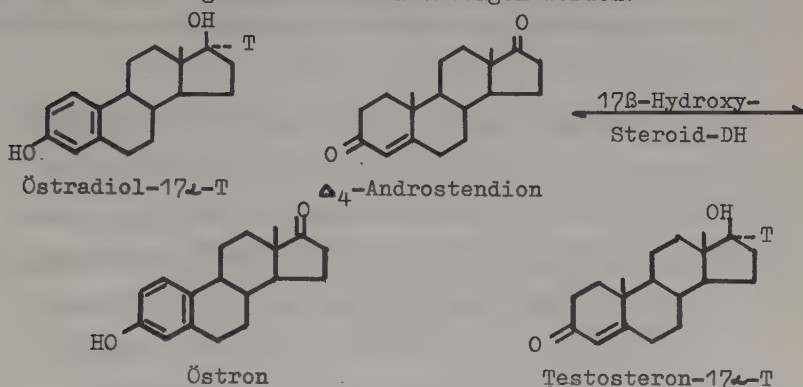
- b) der Hauptteil der von der Zelle benötigten Energie durch Verbrennung des Wasserstoffs in der Atmungskette gewonnen wird (ATP - Bildung).

Die wichtigsten Verteiler des Wasserstoffs in der Zelle sind die beiden Pyridinnucleotide NAD und NADP. Deshalb galt ihrer Spezifität in bezug auf den Substrat-Wasserstoff zunächst unsere besondere Aufmerksamkeit. Während der Gesamtgehalt an Pyridinnucleotiden und die Aktivität der Enzyme in den verschiedensten Organen eingehend untersucht worden sind, ebenso wie die Coenzym-Spezifität isolierter Dehydrogenasen, war es bisher schwierig, etwas über das Ausmaß der Wasserstoff-Verteilung auf beide Coenzyme während einer enzymatischen Umsetzung innerhalb der Zelle auszusagen und somit über den Beitrag an Syntheseleistung (NADPH) oder Energiegewinn (NADH).

In dieser Arbeit soll nun der Versuch unternommen werden, bei gleichzeitiger Anwesenheit aller in der Leberzelle vorhandenen Enzyme und Coenzyme durch Inkubation mit tritiummarkierten Substraten die Spezifität der Dehydrogenasen verschiedener Zellsubstrate zu erarbeiten.

Einen etwas breiteren Raum nehmen im Rahmen der weiteren Untersuchungen über den Wasserstoff-Transport Steroide - und zwar hauptsächlich männliche und weibliche Sexualhormone bzw. deren Abkömmlinge - ein. Nach Untersuchungen von Wenzel et al. kann bis zu 50 % des vom Östradiol bei Oxydation der 17-Hydroxy-Gruppe freiwerdenden Was-

serstoffs auf Keto-Gruppen anderer Steroide z.B. Androstendion nach folgendem Schema übertragen werden:



Das bedeutet, daß ein sehr großer Teil des bei der Oxydation des Östradiols freiwerdenden Wasserstoffs über die Pyridinnucleotide auf weitere Steroide übertragen werden kann. Die hohe Spezifität dieser Übertragung wurde durch vergleichende Umsetzungen mit anderen Wasserstoff-Donatoren (z.B. Lactat) bewiesen.

In diesem Zusammenhang sollte am Beispiel der Steroide überprüft werden, in welchem Verhältnis mit Wasserstoff beladene Akzeptor-Pyridinnucleotide einer definierten Steroid-Dehydrogenase selbst wieder als Donatoren für enzymatische Reduktionen am Steroidmolekül verwendet werden, und in welchem Ausmaß diese Reaktionen an verschiedenen Positionen des Steroidmoleküls (3-Keto-, 17-Keto-Gruppe; Δ⁴-Doppelbindung) wirksam werden.

Durch eine vergleichende Umsetzung mit Isocitrat-2-T sollte die Einwirkung einer NADP-spezifischen Nicht-Steroid Dehydrogenase auf Steroide untersucht werden.

B E D E U T U N G D E R P Y R I D I N N U C L E O T I D E

Die Bedeutung der Pyridinnucleotide beruht auf ihrer Funktion bei der enzymatischen Wasserstoff-Übertragung (4). In diesem durch die Spezifität der entsprechenden Dehydrogenase gesteuerten Prozeß, dienen Pyridinnucleotide sowohl als Wasserstoff-Akzeptoren (oxydierte Form) als auch als Wasserstoff-Donatoren (reduzierte Form). Im Gegensatz zu anderen Coenzym-Klassen - etwa Flavine - sind die Pyridinnucleotide leicht vom Protein dissoziierbar und dadurch auch für einen Wasserstoff-Transport durch Diffusion geeignet.

Aufgrund der räumlichen Aufteilung der Zelle überwiegen Wasserstoff-Übertragungen zwischen Substraten im extra-mitochondrialen Raum, während in den Mitochondrien der überwiegende Teil des Wasserstoffs in der Atmungskette zu Wasser verbrannt wird. Vor allem zwei Faktoren lenken den Wasserstoff-Austausch durch Pyridinnucleotide:

- a) die Existenz von zwei verschieden strukturierten Pyridinnucleotiden, nämlich NAD und NADP ,
(Enzyme sind überwiegend nur für ein Coenzym spezifisch, so daß ein Aufbau von zwei getrennten Gruppen wasserstoffübertragender Enzyme möglich ist)
- b) die schon erwähnte Kompartimentierung der Zelle teilt die Pyridinnucleotide in einen extra- und intramitochondrialen Raum, so daß keine oder zumindest nur geringe Möglichkeiten für einen gegenseitigen Austausch bestehen.

Die Verteilung der Pyridinnucleotide ist in den Organen unterschiedlich; diese Unterschiede betreffen vor allen Dingen den Gehalt an oxydiertem und reduziertem NADP. So ist die Leber besonders reich an Gesamt-NADP (oxydierte und reduzierte Form), in den Muskeln ist dieser Anteil dagegen wesentlich geringer.

Mc Lean (1) konnte einen deutlichen Zusammenhang von Coenzymgehalt und Enzymaktivität feststellen. So steigt in Mammagewebe innerhalb der Lactationsperiode bei Ratten der NADP-Gehalt des Gewebes mit der Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase parallel um das 20-fache an.

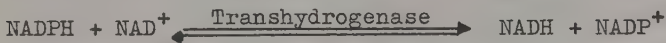
Von Bedeutung sind die Relationen von oxydierten zu reduzierten Formen, der sogenannte Redox-Status der Pyridinnucleotide. Da NAD-spezifische Enzyme vorwiegend mit Substrat-Paaren operieren, deren Redox-Potential positiver als das von NAD/NADH ist, überwiegt hier die oxydierte Form (NAD).

Zur NADP/NADPH-Gruppe gehören vorwiegend Substrate deren Redox-Potential negativer als das des Coenzym-Paares ist. Aus diesem Grund enthält die Zelle NADP überwiegend in der reduzierten Form. Aus diesen Zusammenhängen wird deutlich, daß NAD überwiegend an dehydrierenden, also abbauenden Reaktionen, NADP an hydrierenden, damit biosynthetischen Reaktionen beteiligt ist.

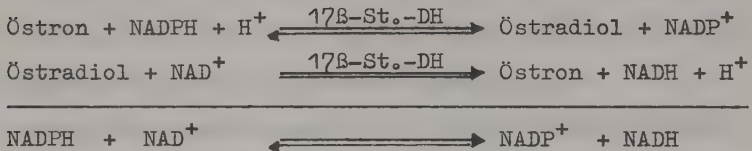
Dieser allgemeine Überblick soll mit einer Betrachtung der Coenzym-Spezifität von Hydroxysteroid-

Dehydrogenasen in Zusammenhang gebracht werden. Hydroxysteroid-Dehydrogenasen besitzen, neben ihrer Möglichkeit einen Wasserstoff-Transfer von einem Substrat auf ein Pyridinnucleotid zu vermitteln, auch die Eigenschaft einer Transhydrogenase-Funktion. Diese, zuerst von Talalay und Williams-Ashman (2) beschriebene Möglichkeit ist über folgendes Schema denkbar:

a) allgemeine Transhydrogenase:



b) spezielle Transhydrogenase der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase:



Voraussetzung einer derartigen Wasserstoff-Übertragung zwischen den Coenzymen ist die Möglichkeit der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, mit beiden Coenzymen wirksame Verbindungen einzugehen.

Das Studium von Reaktionen interessierender Dehydrogenasen mit den beiden Coenzymen NAD und NADP durch Angebot entsprechender, wasserstoffliefernder Substrate ist weitgehend in künstlichen Systemen (Reagenzglas) oder unter vereinfachten Bedingungen (z.B. Angebot nur eines Coenzym) untersucht worden (5 , 6 , 7) (s. Schema Seite 8 Teil A). Inwieweit unter zellphysiologischen Bedingungen und Konzentrationen die verschiedenen Dehydrogenasen NAD oder NADP

als Reaktionspartner benutzen, ist weitgehend ungeklärt. Durch Verwendung von tritiummarkierten Substraten und deren Umsetzung unter in-vivo ähnlichen Bedingungen sollte geklärt werden, in welchem Ausmaß das eine oder andere Coenzym an den enzymatischen Umsetzungen beteiligt wird, und wie weit die so gewonnenen Ergebnisse mit den bisherigen, aus in-vitro Versuchen resultierenden Informationen übereinstimmen (s. Schema Seite 8, Teil B).

Untersuchungsmethoden zur Bestimmung der Pyridinnucleotid-Spezifität von Dehydrogenasen

Bisher verwendet:	Reaktion	Nachweis-Methode
a) optischer Test b) Spektrophotometrie c) K_M-Werte	<pre> graph LR E[Enzym isoliert angereichert, Zellfrakt.] --> S1[Substrat-H] S1 --> S2[Substrat-ox] NAD --> NADH[NADH] NADP --> NADPH[NADPH] S1 -- "entweder oder" --> NAD S1 -- "entweder oder" --> NADP </pre>	a) Extinktionsmessung bei 366 nm b) Absorptionsmessung bei def. Wellenlänge c) Bestimmung der Coenzym-Affinität über die Michaelis-Menten Konstante
In dieser Arbeit verwendet:	<pre> graph LR E[Enzym im Leber- homogenat] --> S1[Substrat-T] S1 --> S2[Substrat-ox] NAD --> NADH[NADH und NADPH] S1 --> NAD S1 --> NADP </pre>	Trennung aller Coenzyme über DEAE-Cellulose mit anschließender Bestimmung der Tritium-Verteilung

WASSERSTOFF-TRANSFER VON TRITIERTEN VERBINDUNGEN AUF
PYRIDINNUCLEOTIDE

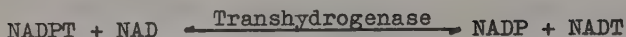
Mit Hilfe tritiummarkierter Substrate wird die Pyridinnucleotid-Spezifität (NAD und/oder NADP) wichtiger dehydrierender Enzyme in der Zelle unter in-vivo ähnlichen Bedingungen ermittelt.

Der Nachteil bisher verwendeter Untersuchungsmethoden war es, oft unter vereinfachten Reaktionsbedingungen arbeiten zu müssen. So wurde einerseits die Coenzym-Spezifität der Dehydrogenasen an isolierten Enzymen (in-vitro) bestimmt, andererseits konnte unter angenäherten in-vivo Versuchsbedingungen (K_M -Werte, Spektralphotometrie) der Umsatz nur eines Reaktionspartners - d.h. entweder NAD oder NADP - gemessen werden (siehe Schema Seite 8, Teil A).

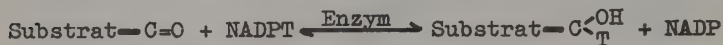
Im Gegensatz zu diesen Untersuchungsmethoden erreichen wir durch Inkubation von tritierten Substraten mit Rattenleberhomogenat, daß die interessierenden Dehydrogenasen nicht isoliert, sondern im Verband aller in der Leber anwesenden Enzyme - einschließlich der beiden Coenzyme NAD und NADP - ihre Umsetzung vollziehen können (siehe Schema Seite 8, Teil B).

Bei der Versuchsdurchführung wurde nur kurzzeitig (1 min.) inkubiert, um ein "Verschmieren" der Aktivität auf beide Pyridinnucleotide und damit eine Zweideutigkeit der Versuchsergebnisse zu vermeiden. Als Ursache einer Aktivitätsverschiebung innerhalb der Pyridinnucleotide sind zu nennen:

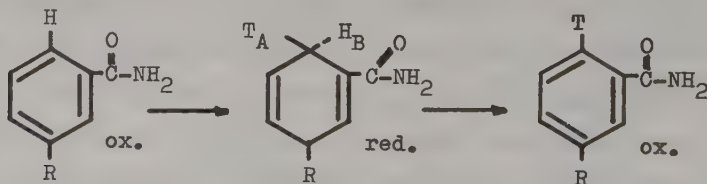
a) Transhydrogenase-Enzyme



b) Verwendung der tritierten Pyridinnucleotide als Wasserstoff-Donatoren (Rückreaktion mit anderen Substraten)



Bei der Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung zwischen den Pyridinnucleotiden (siehe unten) wurde teilweise auch Tritium in den oxydierten Formen (NAD und NADP) gemessen, was durch die Untersuchungen von Westheimer (3) und Vennesland (7) über das stereospezifische Verhalten der Enzyme bei der Wasserstoff-Übertragung auf NAD und NADP erklärt werden kann. So wird in unserem Fall das Tritium-Isotop enzymatisch auf der A-Seite in den Nicotinsäureamid-Ring des Coenzym eingeführt, durch Dehydrierung aber ein Wasserstoff der B-Seite entnommen. In diesem Fall enthält das dehydrierte (oxydierte) Pyridinnucleotid ebenfalls Radioaktivität.



Zunächst wurde die Coenzym-Spezifität der Lactat-Dehydrogenase* untersucht. Dazu wurde Lactat-2-T mit weiblichem Rattenleberhomogenat unter Zugabe von

* Lactat-Dehydrogenase = LDH

Pyridinnucleotiden 1 min. inkubiert. Die wässrige Phase - sie enthält die interessierenden Coenzyme - wurde nach Aufarbeitung gefriergetrocknet und der Rückstand durch einen Anionenaustauscher (DEAE-Cellulose) getrennt (näheres s. Methodik). So konnten die einzelnen Pyridinnucleotid-Fractionen separiert und ihr Tritiumgehalt bestimmt werden. In Abb. 1 wird diese prozentuale Tritiumverteilung zwischen der NAD- und NADH-Fraktion einerseits und der NADP- und NADPH-Fraktion andererseits wiedergegeben.

Dieses Verteilungsverhältnis gibt Aufschluß über die Aktivität zwischen Dehydrogenase und Coenzym und ist damit ein Ausdruck der Coenzym-Spezifität des die Umsetzung katalysierenden Enzyms. Da etwa 99 % der bestimmten Radioaktivität auf die NAD- und NADH-Fraktion entfallen (siehe Abb. 2), kann auf eine sehr intensive Bindung (Affinität) der Dehydrogenase zu NAD geschlossen werden. Damit kann die überwiegend aus in-vitro Untersuchungen der Lactat-Dehydrogenase resultierende Umsetzungsgleichung bestätigt werden.



Im folgenden Versuch wurde nach der gleichen Methode die aus in-vitro Versuchen mit isoliertem Enzym bekannte NAD-Spezifität der Alkohol-Dehydrogenase* (11) überprüft. So zeigte die Alkohol-Dehydrogenase nur in Gegenwart des Diphosphopyridinnucleotids eine gesteigerte Aktivität. Deshalb erwarteten wir in Leberhomogenat eine

* Alkohol-Dehydrogenase = ADH

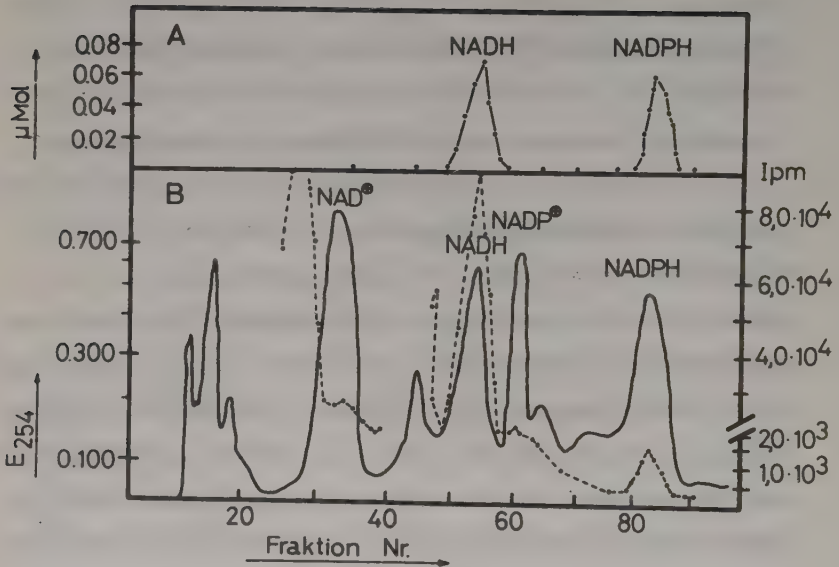


Abb. 1

=====

Bildung tritiummarkierter Pyridinnucleotide nach Inkubation von Lactat-2-T in Rattenleberhomogenat (♀)

Die Pyridinnucleotid-Fractionen wurden über eine DEAE-Cellulose Säule getrennt und anschließend ihre Radioaktivität gemessen.

- A. Menge der im Aliquot gemessenen, reduzierten Pyridinnucleotide.
- B. Die durchgezogene Linie zeigt die Extinktion des Säuleneluats bei 254 nm, die gestrichelte Linie gibt die Radioaktivitätsverteilung an.

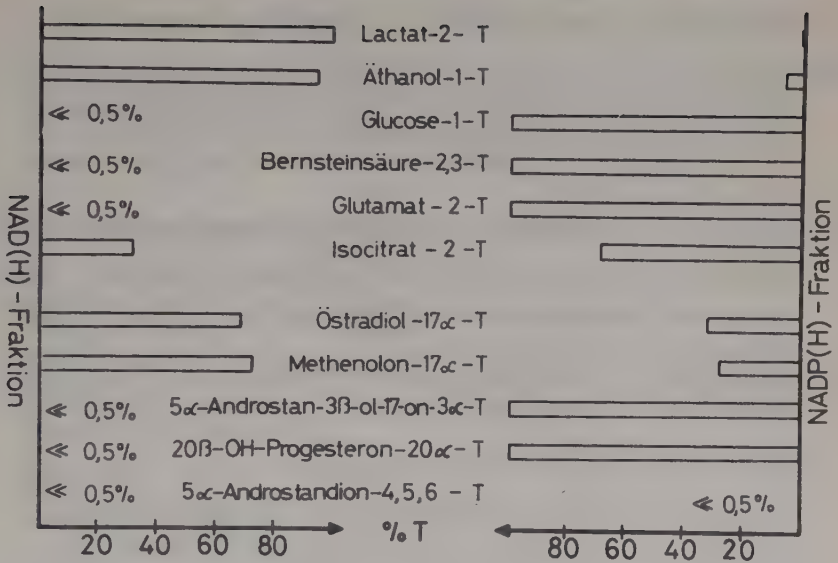


Abb. 2

=====

Tritiumgehalt der Pyridinnucleotidfraktionen nach Inkubation tritierter Substrate mit Rattenleberhomogenat (♀)

Die Tritiumaktivität der NAD(H)- bzw. NADP(H)-Fraktionen wurde aus Verteilungskurven (Abb. 1) errechnet, wobei die Gesamtaktivität der Pyridinnucleotidfraktionen nach Abzug der Nullwerte 100 % entspricht.

rechte Abzisse : Tritiumgehalt der NADP(H)-Fraktion

linke Abzisse : Tritiumgehalt der NAD(H)-Fraktion

Reaktion gemäß folgender Gleichung:



Wir fanden jedoch 5,2 % der Tritium-Aktivität aller Pyridinnucleotide in der NADP(H)*-Fraktion (s. Abb. 2).

Bei der Inkubation von Bernsteinsäure-2,3-T wurden, da das Coenzym der Succinat-Oxydase FAD ist, keine markierten Pyridinnucleotide erwartet. Wir isolierten jedoch nach der angegebenen Inkubationsdauer entgegen unserer Erwartung markierte Pyridinnucleotide und zwar ausschließlich in der NADP(H)-Zone (s. Abb. 2).

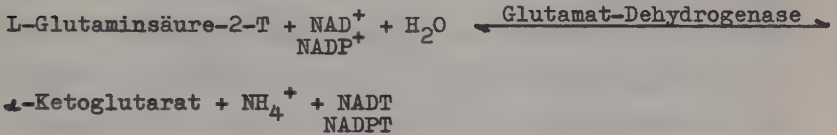
Keine Radioaktivität im Bereich der NAD- und NADH-Fraktion wurde nach Inkubation von weiblichem Rattenleberhomogenat mit Glucose-1-T gefunden (s. Abb. 2). Dieses Ergebnis entspricht vollkommen der aus in-vitro Versuchen gewonnenen Reaktionsgleichung.



Das die Metabolisierung katalysierende Enzym - Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase - reagiert somit spezifisch mit NADP als Tritium- und damit als Wasserstoff-Akzeptor.

* NADP(H) = NADP + NADPH

Durch Inkubation mit Glutamat-2-T und Isocitrat-2-T untersuchten wir das Verhalten zweier Enzymsysteme im intramitochondrialen Raum der Zelle. Aus Untersuchungen der Glutamat-Dehydrogenase (12) ist bekannt, daß sie mit beiden Coenzymen reaktionsfähige Komplexe bildet,



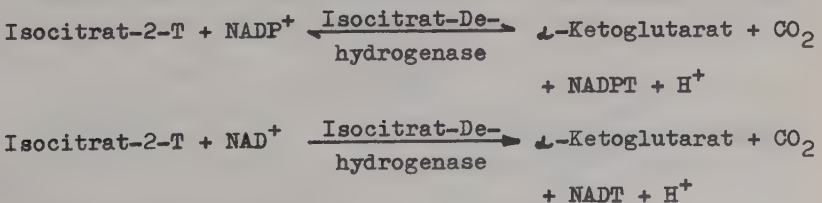
wobei die Coenzym-Spezifität der Dehydrogenase innerhalb der Säuger stark variiert.

Nach Inkubation von Glutamat-2-T mit weiblichem Rattenleberhomogenat isolierten wir nur markiertes NADP(H) (s. Abb. 2).

Nach Otani et al. (14) gibt es bei Säugertieren 3 Enzyme für die Oxydation von Isocitrat:

- a) eine lösliche threo-D₅-Isocitrat-NADP-Oxidoreduktase im extramitochondrialen Raum
- b) ein NADP-abhängiges Enzym in den Mitochondrien
- c) eine threo-D₅-Isocitrat-NAD-Oxidoreduktase, ebenfalls in den Mitochondrien lokalisiert.

Die Umsetzung von Isocitrat wird in bisherigen Untersuchungen über diese Dehydrogenasen durch folgende Gleichungen wiedergegeben:



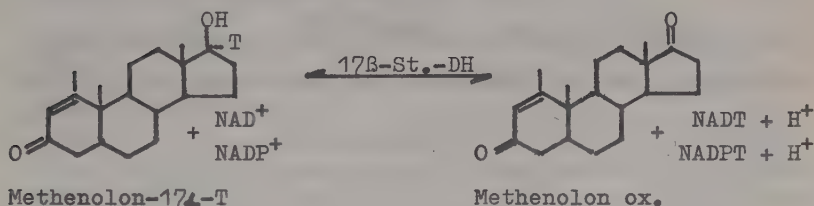
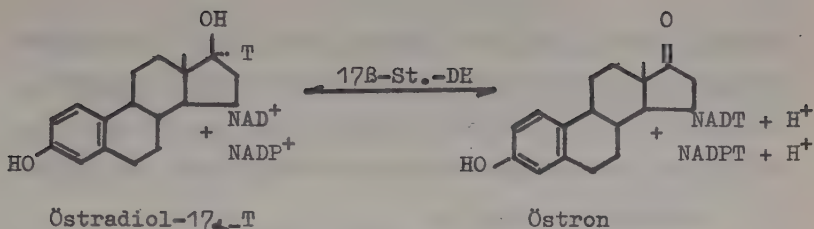
Damit katalysiert die NAD-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase eine irreversible und ausschließlich innerhalb der Mitochondrien ablaufende Reaktion (15,16), die beiden NADP-abhängigen Enzymsysteme oxydieren Isocitrat in einer Gleichgewichtsreaktion - teilweise auch im extramitochondrialen Raum der Zelle.

So war bei der Inkubation mit Isocitrat-2-T sowohl im NAD(H)* als auch im NADP(H)-Bereich Tritium-Aktivität zu erwarten. Die in meinem Versuch gefundene Aktivitätsverteilung entsprach einem NAD(H)/NADP(H)-Verhältnis von 1 : 3,2. Dies beweist eine deutliche Bevorzugung des NADP als Wasserstoff-Akzeptor.

Während die bisher besprochenen Dehydrogenasen überwiegend nur mit einem Coenzym (NAD oder NADP) reagierten, war dieses Verhalten bei gewissen Hydroxysteroid-Dehydrogenasen nicht zu erwarten. So ist durch in-vitro Untersuchungen bekannt (17), daß die 3- und 17-Hydroxysteroid-Dehydrogenase von Ratten mit beiden Coenzymen (NAD und NADP) reagiert.

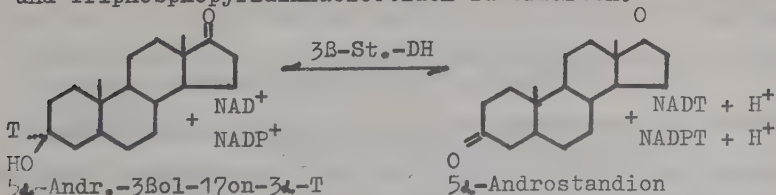
Durch Inkubation von Östradiol-17_α-T und Methenolon-17_α-T mit Leberhomogenat weiblicher Ratten (s. Schema) konnte die Coenzym-Spezifität der 17_β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase unter angenäherten in-vivo Bedingungen bestimmt werden.

* NAD(H) = NAD + NADH



Nach den aus diesen Versuchen vorliegenden Ergebnissen wird von der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase NAD als Wasserstoff-Akzeptor bevorzugt, denn etwa 70 % der bestimmten Tritium-Aktivität entfallen auf den Bereich der Diphosphopyridinnucleotide (s. Abb. 2).

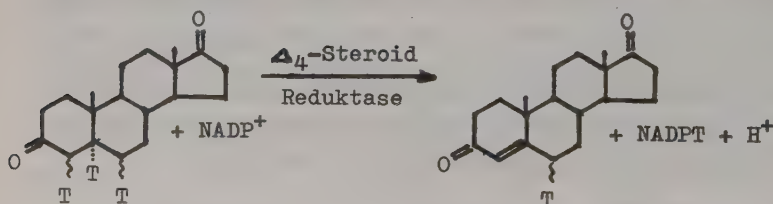
Die in der Literatur beschriebenen Untersuchungen der 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (K_M -Werte, angereichertes Enzym) (17) beweisen ein vollkommen ausgeglichenes Verhalten der Dehydrogenase gegenüber den beiden Pyridinnucleotiden. So war nach Inkubation von 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T mit weiblichem Rattenleberhomogenat ein ausgeglichenes Verhältnis von tritierten Di- und Triphosphopyridinnucleotiden zu erwarten.



Entgegen dieser Vermutung reagiert unter in-vivo ähnlichen Versuchsbedingungen die 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase ausschließlich mit NADP als primärem Wasserstoff-Akzeptor, denn im Bereich der NAD(H)-Fraktion wurde keine Radioaktivität gemessen (s. Abb. 2).

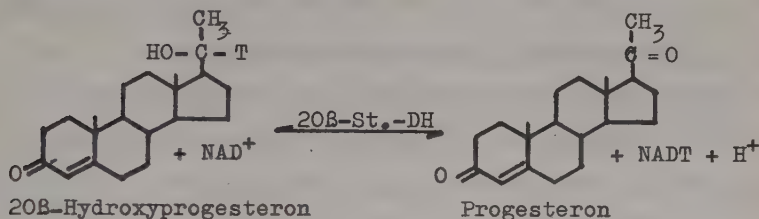
In zwei weiteren Versuchsserien konnte durch Angebot tritierter Steroide auch die Coenzym-Spezifität der Δ_4 -Steroid-Reduktase und der 20β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase überprüft werden.

Während der Inkubation von 5α -Androstandion-4,5,6-T mit Leberhomogenat weiblicher Ratten können tritierte Pyridinnucleotide nur durch Dehydrierung des A-Ringes unter Bildung von Δ_4 -Androstandion entstehen (s. Schema unten). Das Auffinden tritierter Pyridinnucleotide wäre so der Beweis für die Möglichkeit des Enzyms, Doppelbindungen in den A-Ring einzuführen und damit hydrierend zu wirken. Aus der Abb. 2 ist zu entnehmen, daß innerhalb der Pyridinnucleotid-Fractionen keine Radioaktivität gemessen werden konnte. Eine enzymatische Reaktion nach folgender Gleichung ist demnach in der Rattenleber nicht möglich.



Über die Coenzym-Spezifität der 20β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase liegen einander widersprechende Aussagen vor (24,25). Jedoch war aus Untersuchungen über die 20α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17) zu vermuten, daß

auch das 20 β -Enzym nur mit einem Coenzym zu reagieren imstande ist. Das in 20 α -Position tritierte Steroid wird in Anlehnung an die oben erwähnten Untersuchungen enzymatisch wie folgt oxydiert:



Das Ergebnis unserer Untersuchungen deutet jedoch auf ein ausschließlich NADP-spezifisches Verhalten der 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase hin (siehe Abb. 2).

Diskussion der Versuchsergebnisse

Die Coenzym-Spezifität verschiedener Dehydrogenasen

Es wurde erstmals unter angenäherten in-vivo Bedingungen die Coenzym-Spezifität wichtiger Dehydrogenasen bestimmt. Zu diesem Zweck wurden tritierte Zellsubstrate mit Rattenleberhomogenat inkubiert, die dabei gebildeten tritierten Pyridinnucleotide abgetrennt und ihre Radioaktivitätsverteilung bestimmt (s. Methodik). Alle verwendeten Substrate hatten ähnliche spezifische Aktivitäten ($\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$).

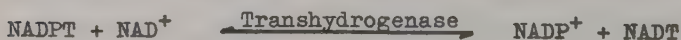
Zunächst wurden Lactat-, Alkohol-, Glucose-6-phosphat-, Isocitrat- und Glutamat-Dehydrogenase auf

ihr Verhalten gegenüber NAD und NADP untersucht.

Nach Inkubation von Lactat-2-T mit weiblichem Rattenleberhomogenat wurden nur 0,7 % der Gesamt-Radioaktivität aller Pyridinnucleotide im NADP(H)-Bereich gefunden. Nach Untersuchungen von Mehler (9) und Meister et al. (10) an isolierter (gereinigter) Herz-Lactat-Dehydrogenase ist eine, wenn auch stark verminderte Aktivität der Dehydrogenase mit NADP zu beobachten. So führt das Angebot von NADP zu einem Abfall des Umsatzes um das etwa 150-fache. Die starke Bindung (Affinität) der Lactat-Dehydrogenase gegenüber dem Wasserstoff-Akzeptor NAD wird damit auch unter den von uns geänderten Reaktionsbedingungen aufrechterhalten.

Nach Pullmann et al. (11) oxydiert isolierte Alkohol-Dehydrogenase Äthanol in Gegenwart von NAD etwa 100 mal schneller als in Gegenwart des Triphosphopyridinnucleotids. Aus unseren angenäherten in-vivo Versuchen ergibt sich ein um den Faktor 5 höherer Wert, denn 5 % der bestimmten Radioaktivität entfallen auf die NADP(H)-Zone. Offensichtlich kommt dem Wasserstoff des Alkohols eine größere Bedeutung bei reduktiven Synthesen zu, als bisher angenommen.

Daß eine mögliche Transhydrogenase-Reaktion während kurzer Inkubationszeiten keinen nivellierenden Effekt auf die Aktivitätsverteilung der Pyridinnucleotide nach folgendem Schema ausübt,



wird am Beispiel des Abbaus von Glucose-1-T deutlich.

Eine Analyse der Pyridinnucleotide auf ihre Radioaktivitäts-

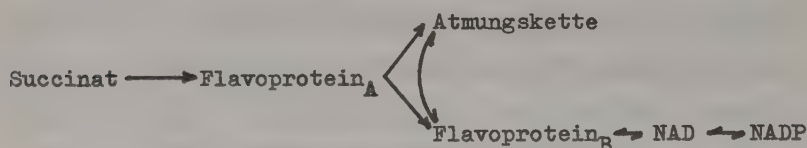
verteilung ergab keine Aktivität im NAD(H)-Bereich. Demnach ist nicht nur isolierte Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase eine NADP-spezifische Dehydrogenase, sondern auch unter angenäherten in-vivo Bedingungen findet man diese absolute NADP-Spezifität.

Problematisch erscheint die Umsetzung von markierter Bernsteinsäure mit weiblichem Rattenleberhomogenat. Zunächst sollte diese Umsetzung als Beweis für die Spezifität der angewandten Methodik dienen. Da als Coenzym der Succinat-Oxydase FAD dient, erwarteten wir keine markierten Pyridinnucleotide, fanden jedoch - und zwar ausschließlich in der NADP(H)-Fraktion - ein radioaktives Maximum.

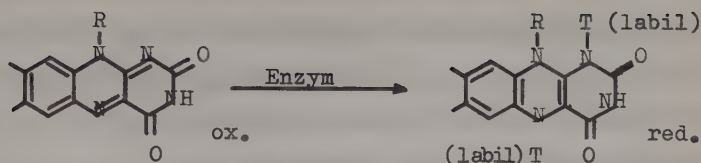
Daß sich tatsächlich, wahrscheinlich sekundär markiertes NADP(H) bildet, geht auch aus Ergebnissen der Inkubationsversuche von Bernsteinsäure-2,3-T und Δ_4 -Androstendion mit Leberhomogenat weiblicher Ratten hervor. Denn nach der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der Steroid-Metabolite war eindeutig 5 α -Androstan-3 α -T (26) nachzuweisen. Da die Steroid- Δ_4 -Reduktase nur mit reduziertem NADPH als Coenzym arbeitet (18), muß tritiertes Triphosphopyridinnucleotid entstanden sein.

Wir interpretieren die gemessene NADPT-Bildung durch eine Umsetzung der Bernsteinsäure in den Mitochondrien. Dort ist Succinat als Energie-Lieferant der Atmungskette (19) bekannt. Gleichzeitig konnte in Versuchen mit Lebermito-

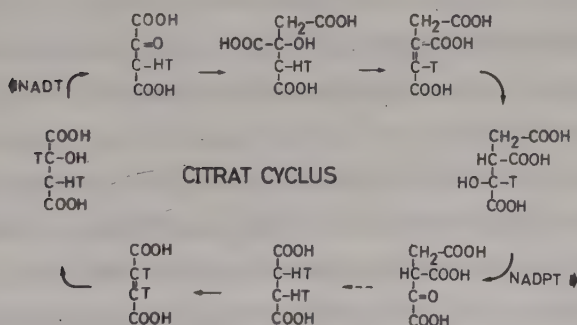
chondrien ein direkter Einfluß von Succinat auf die Reduktion von NAD und NADP beobachtet werden (27). Dabei ist zu beachten, daß als prosthetische Gruppe der Succinat-Oxydase ein Flavin-Molekül und nicht etwa ein Pyridinnucleotid gilt. Das bedeutet, daß der Wasserstoff der Bernsteinsäure nur indirekt auf NADP übertragen werden kann - etwa nach folgendem Schema (4):



Ferner wird aus Bernsteinsäure-2,3-T in großem Umfang radioaktives Wasser (HTO) gebildet. Ein Vergleich der aus verschiedenen Inkubationsansätzen bestimmten HTO-Mengen zeigt für die Bernsteinsäure eine erheblich gesteigerte Dehydrierung (Lactat 1,7 %, Glucose 0,8 %, aber Bernsteinsäure 53,2 % HTO). Es muß dabei berücksichtigt werden, daß ein Teil des radioaktiven Wassers ohne Mithilfe der Atmungskette gebildet wird, denn Bestandteil der Flavine, als Coenzym der Succinat-Oxydase, ist der Isoalloxazin-Ring. Das durch Dehydrierung der Bernsteinsäure übernommene und am Stickstoff gebundene Tritium ist labil gebunden, also dissoziabel und daher mit den Protonen des Lösungsmittels (Wasser) austauschbar:



Eine Metabolisierung der radioaktiven Bernsteinsäure zum markierten Isocitrat (Citrat-Cyclus), dessen Dehydrogenase NADP-spezifisch reagiert, bietet keine Erklärung des Befundes.



Aus diesem Schema ist zu entnehmen, daß dabei ein Teil des Succinat-Tritiums via Malat auf NAD übergeht, zum anderen wird aus Abb. 2 deutlich, daß die Isocitrat-Dehydrogenase einen erheblichen Teil ihres Wasserstoffs auf NAD überträgt. Die Dehydrierung der markierten Bernsteinsäure verläuft dagegen ohne Bildung tritierter Diphosphopyridinnucleotide.

Die Umsetzung von tritierter Glutaminsäure im Rattenleberhomogenat zeigt eine deutliche Affinität der Glutamat-Dehydrogenase zum Triphosphopyridinnucleotid. Obwohl das Enzym auch mit NAD einen reaktionsfähigen Komplex bildet (12), zeigt sich unter in-vivo ähnlichen Bedingungen eine eindeutige Bevorzugung des NADP. Klingenberg wies ebenfalls auf eine derartige Spezifität in den Lebermitochondrien hin (4).

Bei Verstoffwechselung von Isocitrat-2-T durch die Isocitrat-Dehydrogenase im Rattenleberhomogenat war nach Schema Seite 15 sowohl markiertes NAD(H) als auch NADP(H) zu erwarten. Eine eindeutige Aussage über die Enzymaktivitäten der verschiedenen Isocitrat-Dehydrogenasen in der intakten Zelle ist bisher nicht möglich (21). Unsere Methode erlaubt es, aus der Radioaktivitätsverteilung zwischen NAD und NADP summarisch das Konkurrenzverhalten der beiden NADP-abhängigen Enzyme gegenüber der NAD-abhängigen Isocitrat-Dehydrogenase zu charakterisieren. Es wird hier gezeigt, daß durch NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenasen etwa $\frac{3}{4}$ des angebotenen radioaktiven Isocitrats verstoffwechselt wird.

Die Coenzym-Spezifität der 3 β - und der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase wurde durch Oxydation von in spezifischer Stellung mit Tritium markierten Steroiden in Rattenleberhomogenat weiblicher Tiere untersucht (siehe Formelschema Seite 17). Dabei fällt für die Substrate Östradiol und Methenolon eine ähnliche Radioaktivitätsverteilung zwischen den gemessenen Pyridinnucleotiden auf. So befinden sich nach der Umsetzung von Methenolon 28 %, bei Östradiol

31 % der Radioaktivität im NADP(H)-Bereich, was einer um den Faktor 2 erhöhten Affinität der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase gegenüber NAD entspricht.

Die Ursache dieser ähnlichen Tritiumverteilung zwischen den Pyridinnucleotiden ist wahrscheinlich eine Verstoffwechselung der beiden Steroidhormone durch ein identisches Enzym. Es sei aber daran erinnert, daß eine Östradiol- (d.h. Substrat-) spezifische 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus menschlicher Placenta isoliert werden konnte (22, 23).

Bisherige Untersuchungen der 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17) ergaben ein vollkommen ausgeglichenes Verhalten gegenüber den beiden Coenzymen NAD und NADP. Interessanterweise konnte nach Inkubation von 5 Δ -Androstan-3 β -ol-17-on-3 Δ -T mit weiblichem Rattenleberhomogenat kein tritiiertes Diphosphopyridinnucleotid isoliert werden. Offensichtlich reagiert die 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase unter in-vivo ähnlichen Bedingungen NADP-spezifisch.

In einer weiteren Versuchsserie wurde Rattenleberhomogenat mit 5 Δ -Androstandion-4,5,6-T inkubiert. Es sollte damit untersucht werden, ob die Δ_4 -Steroid-Reduktase in der Lage ist, das markierte Substrat zu Δ_4 -Androstandion zu dehydrieren. Gleichzeitig sollte versucht werden, dabei gebildete tritierte Pyridinnucleotide zu isolieren, um über das verwendete Coenzym dieser Reaktion etwas auszusagen (s. Formelschema Seite 18).

Wie aus Abb. 2 zu entnehmen ist, konnte innerhalb der gesamten Pyridinnucleotid-Fractionen keine Tritiumaktivität gemessen werden. Das Enzym Δ_4 -Steroid-Reduktase kann somit nur hydrierend auf den A-Ring des Steroidgerüsts einwirken - d.h. die Δ_4 -Reduktion ist irreversibel.

Untersuchungen mit gereinigter, tierischer 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase liegen nicht vor, da das Enzym fest an die Mikrosomenfraction der Zelle gebunden ist (24) und bisher nicht isoliert werden konnte. Als Coenzym der 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase wird NAD und NADP (24, 25) diskutiert (Schema der enzymatischen Umsetzung s. Seite 19). Durch unsere angenäherten in-vivo Versuche ermittelten wir aus Rattenleber weiblicher Tiere eine ausschließlich NADP-spezifische 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase.

Durch Inkubation tritierter Zellsubstrate mit Rattenleberhomogenat und anschließender Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung enzymatisch tritierter Pyridinnucleotide ist es gelungen, erstmals die Coenzym-Spezifität wichtiger Dehydrogenasen unter in-vivo ähnlichen Bedingungen zu untersuchen.

So konnte festgestellt werden, daß

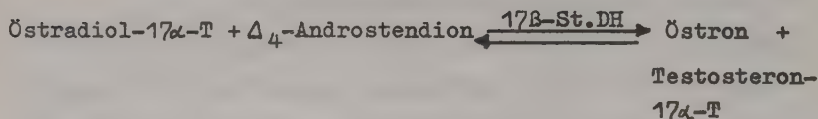
- a) die Glutamat-Dehydrogenase - obwohl sie nach in-vitro Untersuchungen auch mit NAD einen reaktionsfähigen Komplex bilden kann - in Rattenleberhomogenat ausschließlich NADP-spezifisch reagiert,
- b) Bernsteinsäure unter den von uns gewählten Bedingungen überwiegend im engeren Bereich der Atmungskette und weniger im Bereich des Citrat-Cyclus verstoffwechselt wird,

- c) Isocitrat etwa 3,1 mal häufiger über NADP-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase als über die konkurrierende NAD-abhängige Dehydrogenase oxydiert wird (ein Verteilungsverhältnis war bisher unbekannt),
- d) von den untersuchten Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (3 β , 17 β , 20 β) nur die 17 β -Dehydrogenase eine, aus bisherigen in-vitro Versuchen bekannte, zweifache Coenzym-Spezifität zeigt.

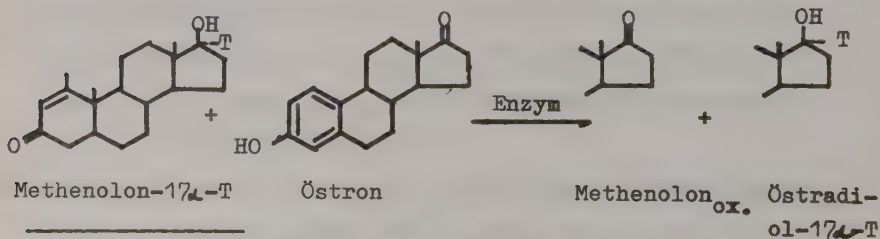
Entgegen bisherigen Befunden reagiert die 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase unter in-vivo ähnlichen Bedingungen NADP-spezifisch; ebenso die ebenfalls in Rattenleberhomogenat untersuchte 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase.

WASSERSTOFFTRANSFER ÜBER PYRIDINNUCLEOTIDE AUF STEROIDE

Frühere Arbeiten von Wenzel et al. (28, 29, 30) berichten von einem bevorzugten Wasserstoff-Transfer zwischen Steroiden bei Inkubation mit Rattenleberschnitten. So konnten bei diesen enzymatischen Umsetzungen vom Östradiol-17 α -T bis zu 60 % der eingesetzten Tritium-Aktivität (Äquivalente für Wasserstoff) auf Ketosteroide als Wasserstoff-Akzeptoren übertragen werden. In Ansätzen, bei denen der Akzeptor oder Donator gegen ein Nichtsteroid ausgetauscht war, konnte kein Tritium-Transfer in diesen Größenordnungen beobachtet werden.



Diese Untersuchungen betreffen hauptsächlich den Wasserstoff-Transport vom C₁₇-Atom des Donator-Steroids in die gleiche Position eines Akzeptor-Steroids.



* 17 β -St.DH = 17 β -Steroid-Dehydrogenase

In diesem Teil der Arbeit soll der Tritium-Transfer von unterschiedlich markierten Steroiden auch auf andere, biochemisch interessante Ketogruppen und Doppelbindungen am Steroidgerüst ausgedehnt und mit dem von Nichtsteroiden verglichen werden. Dabei wird das Ausmaß der Wasserstoff-Übertragung nicht in Prozent der im Akzeptormetaboliten wiedergefundenen Aktivität berechnet; denn eine bessere Angabe über die Spezifität des Donator-Wasserstoffs als Reduktionsmittel ist - insbesondere bei einem Vergleich zwischen verschiedenen Steroid-Akzeptoren - durch den Begriff der relativen spezifischen Aktivität möglich.

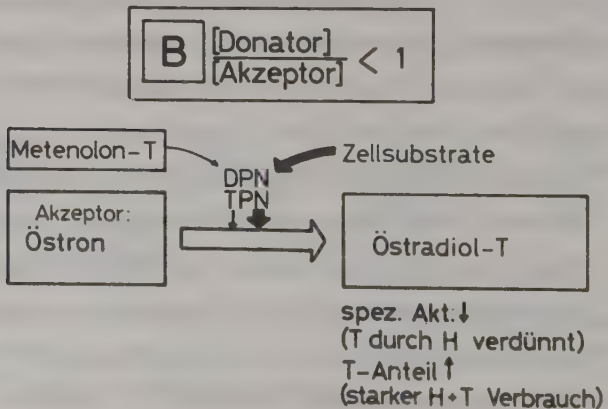
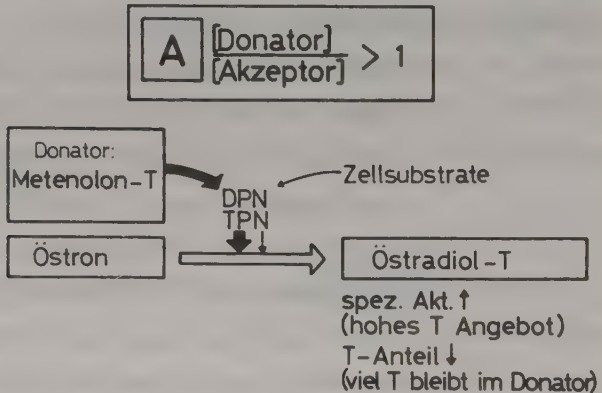
Dabei wird die übernommene Aktivität im Akzeptormetaboliten in $\mu\text{Ci T}/\mu\text{Mol}$ in Relation zur spezifischen Aktivität ($\mu\text{Ci T}/\mu\text{Mol}$) des Donators gesetzt - wobei letztere definitionsgemäß 100 % entspricht. Das heißt, wird jedes zweite Wasserstoffatom des Donators auf den Akzeptor übertragen, ist die relative spezifische Aktivität 50 %, wird jedes vierte Atom übertragen, nur 25 %.

Die Anwendung des Begriffes der relativen spezifischen Aktivität vermeidet fehlerhafte Interpretationen von Versuchsergebnissen, die entstehen können durch:

- a) unterschiedliche Metabolisierungs-Geschwindigkeiten zwischen Akzeptor- und Donator-Molekül (zwangsläufig führt eine schnelle Metabolisierung des Donators in Vergleich zum Akzeptor zu einem größeren prozentualen Wasserstoff-Einbau und zu einem vergleichsweise geringeren prozentualen Tritium-Einbau im Akzeptor).

- b) Sie ist unabhängig von der Konzentration des Akzeptor-Moleküls durch die Angabe in $\mu\text{Ci T}/\mu\text{Mol}$ (kleine Akzeptor-Konzentrationen bedeuten geringen Tritium-Einbau, große Akzeptor-Konzentrationen steigende Einbauraten).

Im folgenden Schema wird der Einfluß steigender Akzeptor-Konzentrationen auf die relative spezifische Aktivität dargestellt.



A

Hohe relative spezifische Aktivitäten bei kleinen Akzeptor-Konzentrationen

Falls hohe Donator-Konzentrationen (Methenolon- 17α -T) mit Tritium-Verlust oxydiert werden, entstehen größere Mengen an markierten Pyridinnucleotiden. Ist die Akzeptor-Konzentration klein (Östron), wird dieser Akzeptor überwiegend durch markierte Pyridinnucleotide reduziert, d.h. der Aktivitätsanteil $\mu\text{Ci T}/\mu\text{Mol}$ im gebildeten Östradiol ist sehr groß (hohe relative spezifische Aktivität).

B

Kleine relative spezifische Aktivitäten bei großen Akzeptor-Konzentrationen

Ist die Donator-Konzentration im Verhältnis zur Akzeptor-Konzentration sehr klein, dann entstehen nur geringe Mengen an tritierten, reduzierten Pyridinnucleotiden. Der Donator wird überwiegend durch Pyridinnucleotide anderer Zellsubstrate (die kein Tritium enthalten) reduziert, so daß der Aktivitätsanteil in $\mu\text{Ci T}/\mu\text{Mol}$ des gebildeten Östradiols sehr klein ist (kleine relative spezifische Aktivität).

In Veröffentlichungen unserer Arbeitsgruppe (43, 44) wurde unter Verwendung des Begriffes der relativen spezifischen Aktivität über den Wasserstoff-Transport zwischen Steroiden berichtet. In diesen Arbeiten handelt es sich jedoch ausschließlich um die Wasserstoff-Übertragung von Methenolon- 17α -T bzw. Östradiol- 17α -T auf Östron und 3-Androsten- 17α -on.

In den vorliegenden Untersuchungen wird der Wasserstoff-Transport aus bestimmten Positionen verschiedener Steroid-Donatoren a) auf die 17-Keto-Gruppe des Östrons

b) auf die Doppelbindung im Ring A
von Δ_4 -Androsten- 3α -on und

c) auf die 3-Keto-Gruppe von Δ_4 -Androsten-3-on untersucht.

Damit wird die Wasserstoff-Einbaurate aus Isocitrat-2-T verglichen.

Es muß jedoch erwähnt werden, daß im Gegensatz zu den bisherigen Versuchen Rattenleberhomogenat als Enzymquelle benutzt wurde statt Leberschnitten.

Spezifität des Wasserstoffs verschiedener Donatoren bei der Reduktion von 17-Ketosteroiden (Abb. 3)

Als Wasserstoff-Akzeptor in dieser Versuchsserie diente $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Östron mit bekannter spezifischer Aktivität ($\mu\text{Ci } ^{14}\text{C}/\mu\text{Mol}$), das durch die enzymatische Umsetzung teilweise zu $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Östradiol reduziert wird. Wenn, wie im vorliegenden Fall, die Wasserstoff-Lieferanten Tritium enthalten (Isocitrat-2-T, 5α -Androstan- 3β -ol-17-on- 3α -T, Methenolon-17 α -T) wird ein Teil dieses radioaktiven Wasserstoffs auch im Östradiol wiedergefunden.

Abb. 3 zeigt den für alle Umsetzungen charakteristischen Abfall der relativen spezifischen Aktivitäten mit steigender Akzeptor-Konzentration (s. Schema Seite 30).

Die dargestellten Meßwerte lassen erkennen, daß der in das Östradiol eingebaute Tritiumanteil aus Isocitrat-2-T und 5α -Androstan- 3β -ol-17-on- 3α -T gleich ist. Denn bei einer Änderung der Akzeptor-Konzentration von 0,8 auf etwa 100 $\mu\text{Mol/l}$ fällt die relative spezifische Aktivität des gebildeten Östradiols für beide Donatoren von etwa 8 auf 0,2 %.

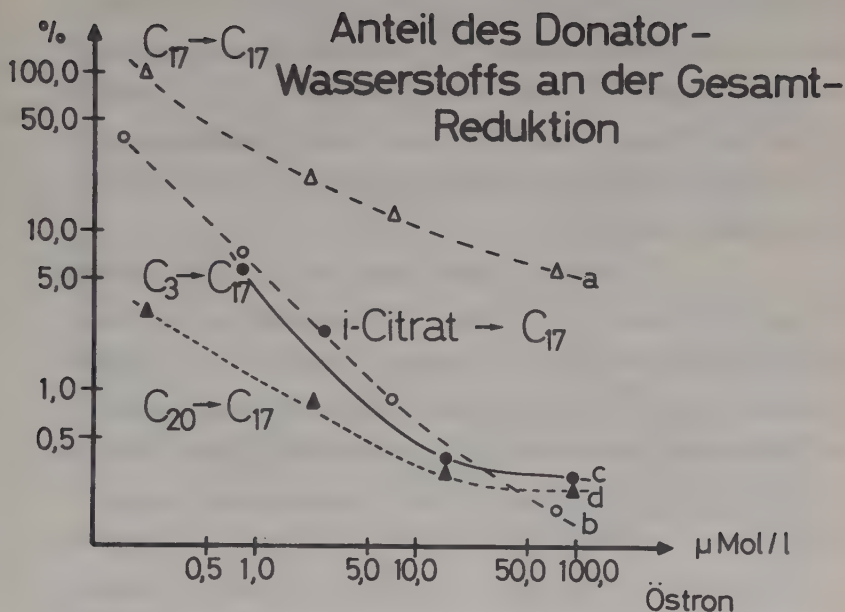


Abb. 3

Anteil des Donator-Wasserstoffs an der Gesamtreduktion von Östron

Zusammensetzung der Ansätze siehe Methodik. Die erhaltenen Meßpunkte sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

Abzisse : Akzeptor-Konzentration in µMol/l

Ordinate : spez. Aktivität (µCi T/µMol) des gebildeten Östradiols bezogen auf die spez. Aktivität des Donators in %.

Es bedeuten:

	Donator (5-6 µM)	Akzeptor
a) $C_{17} - C_{17}$	Methenolon-17 α -T	4- 14 C-Östron
b) i-Cit - C_{17}	Isocitrat-2-T	"
c) $C_3 - C_{17}$	5 α -Andr.-3 β ol-17on-3 α T	"
d) $C_{20} - C_{17}$	4-Pregn.-20 β ol-30n-20 α T	"

Die Tritium-Einbauraten in Östradiol nach Inkubation mit 20 β -Hydroxy-progesteron-20 α -T sind in der Kurve d dargestellt. Selbst bei geringen Akzeptor-Konzentrationen bleibt der Wasserstoff-Transfer von dem Pregnenderivat auf Östron unter 5 %; d.h. trotz Anwesenheit des Pregnenderivates wird Östron zu 95 % durch Nichtsteroid-Wasserstoff reduziert.

Bemerkenswert bleibt der unterschiedliche Verlauf der Kurve a. In dieser Versuchsserie war Methenolon-17 α -T Wasserstoff- bzw. Tritium-Donator. Bei gleicher Akzeptor-Konzentration (0,8 bis 100 μ Mol/l) ergeben die entsprechenden Werte für die relative spezifische Aktivität das Doppelte, bei kleinen Östron-Konzentrationen sogar das 20-fache der Werte von Isocitrat-2-T bzw. 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T. Es handelt sich hier offenbar um einen enzymatisch begünstigten Wasserstoff-Transfer von C₁₇ eines Donator-Steroids auf die gleiche Position des Akzeptor-Steroids.

Spezifität des Wasserstoffs verschiedener Donatoren bei der Reduktion der 3-Keto-Gruppe von Steroiden (Abb. 4)

Uns stellte sich nun die Frage, ob diese bevorzugte Wasserstoff-Übertragung innerhalb gleicher funktioneller Gruppen auch bei anderen, biochemisch interessanten Positionen des Steroidmoleküls - etwa C₃ und C₄ - zu beobachten ist.

Als ein in Position 3 mit Tritium markiertes Steroid wurde zunächst 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T

Anteil des Donator-Wasserstoffs an der Gesamt-Reduktion

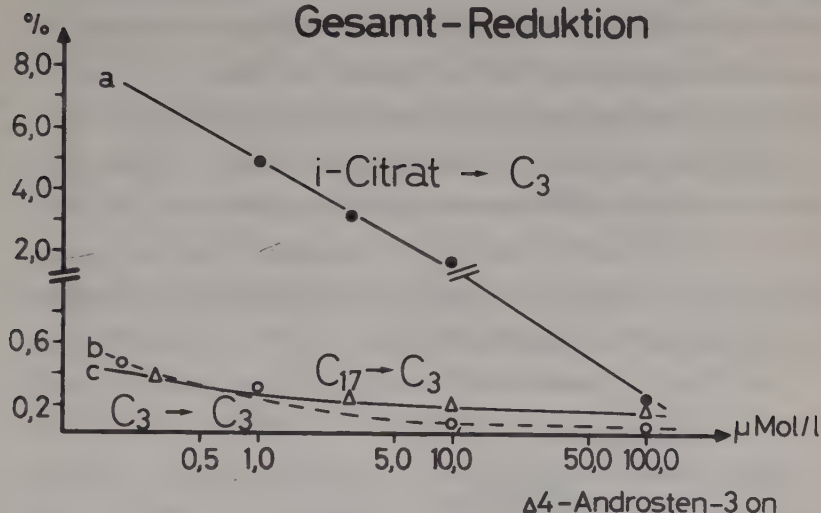


Abb. 4

=====

Anteil des Donator-Wasserstoffs an der Gesamtreduktion von

Δ₄-Androsten-3-on

Bestimmung der spez. Aktivität (μCi/μMol) des Androstan-3-ol nach Inkubation mit verschiedenen Tritium-Donatoren.

Zusammensetzung der Ansätze s. Methodik. Die erhaltenen Meßpunkte sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

Abzisse: Akzeptor-Konzentration in μMol/l

Ordinate: spez. Akt. des gebildeten Androstan-3-ol in μCi T/μMol, bezogen auf die spez. Akt. des Donators in %

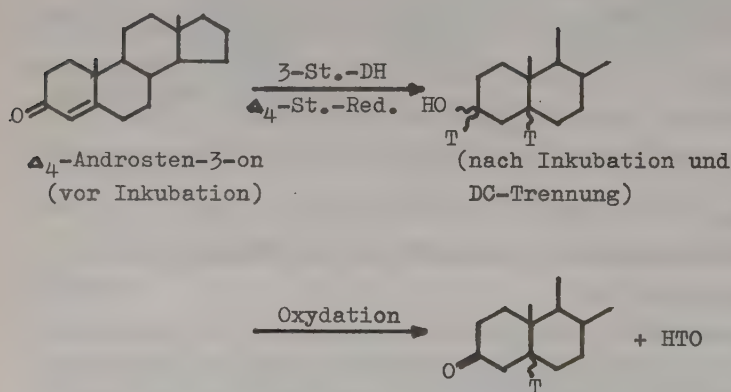
Es bedeuten:

Donator (5-6 μM)

Akzeptor

a) i-Cit-C ₃	Isocitrat-2-T	Δ ₄ -Androsten-3on
b) C ₁₇ - C ₃	Methenolon-17-T	"
c) C ₃ - C ₃	5Δ-Androstan-3Bol-17on-3-T	c "

synthetisiert (näheres s. Synthesen) und zusammen mit Δ_4 -Androsten-3-on als Wasserstoff-Akzeptor in Leberhomogenat weiblicher Ratten inkubiert. Ein Teil des gebildeten 5α -Androstan-3 α -ol wurde zur Bestimmung der μ Mole mit ^{14}C -markiertem Acetanhydrid bekannter spezifischer Aktivität acetyliert, der Rest zur Bestimmung des in C_3 eingebauten Aktivitätsanteils mit Chromtrioxyd-Lösung oxydiert. Die im Ring A verbliebene Restaktivität entspricht dem durch die Δ_4 -Reduktase eingebauten Anteil. Die Ergebnisse der Versuche wurden in Abb. 4 dargestellt.



Die μ Mole 5α -Androstan-3-ol werden durch Umsetzung mit ^{14}C -markiertem Acetanhydrid bestimmt (s. Formelschema der spezifischen Aktivitäten tritierter Steroide $\rightarrow$ Methodik), dessen spezifische Aktivität ($\mu\text{Ci } ^{14}\text{C} / \mu\text{Mol}$) bekannt ist. Aus dem T/ ^{14}C -Verhältnis des Acetats kann somit auf die $\mu\text{Ci T} / \mu\text{Mol}$

5 α -Androstan-3-ol geschlossen werden. Der Aktivitätsanteil in der Hydroxygruppe wird durch Oxydation (s. Methodik) des Metaboliten bestimmt. Er entspricht dem HTO-Anteil nach der Oxydation; dagegen muß der im Steroidgerüst verbliebene Radioaktivitätsanteil der enzymatischen Aktivität der Δ_4 -Reduktase zugeordnet werden.

Es fällt bei einem Vergleich mit Abb. 3 auf, daß Isocitrat-2-T seinen durch Oxydation im Citratcyclus abgegebenen Wasserstoff etwa in der gleichen Größenordnung in Position 3 oder 17 des Steroid-Gerüsts einbauen kann, wobei die Einbaurrate offenbar bei kleinen Akzeptor-Konzentrationen am größten ist. Entsprechend ändert sich die prozentuale spezifische Aktivität bei der Variation des Akzeptors von 1 $\mu\text{Mol/l}$ auf 100 $\mu\text{Mol/l}$ von 4,7 % auf 0,2 %. Ein intensiver Wasserstoff-Transport, ähnlich dem von Methenolon auf Östron, konnte nach Inkubation von 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on mit Δ_4 -Androsten-3-on nicht beobachtet werden. Mit einer Einbaurrate von 0,4 bis etwa 0,09 % bei Änderung der Akzeptorkonzentration von 0,2 bis 100 $\mu\text{Mol/l}$ liegt die Wasserstoff-Übertragung in der gleichen Größenordnung wie bei dem von uns als Wasserstoff-Akzeptor verwendeten 17-markiertem Steroid.

Reduktion der Δ_4 -Doppelbindung

Das Enzym-System der Δ_4 -Reduktase ist von eminenter Bedeutung bei der biologischen Inaktivierung von Ring-A-ungesättigten Steroidhormonen (45).

Einmal besteht Veranlassung zu der Vermutung, daß die Inaktivierung des A-Ringes mit der Eliminierung der Δ_4 -Doppelbindung beginnt, und sekundär die Keto-Gruppe am C_3 -Atom angegriffen wird. Zum anderen entscheidet die Konfiguration des A-Ringes nach seiner Hydrierung über den biologischen Wert des Metaboliten, denn alle 5β -Steroide sind hormonell unwirksam; dagegen sind von den 5α -Verbindungen einige biologisch besonders aktiv z.B. 5α -Androstan- 17β -ol-3-on.

So war es für uns interessant zu wissen, in welchem Ausmaß einmal der bei der Oxydation der Hydroxygruppen am C_3 - und C_{17} -Atom freigesetzte Wasserstoff für die Reduktion der Δ_4 -Doppelbindung Verwendung findet, zum anderen dieses Ergebnis zu vergleichen mit dem Wasserstoff-Lieferanten Isocitrat-2-T, als typischem Wasserstoff-Donator aus der Gruppe der Nichtsteroidoide (Ergebnisse der Versuchsserie in Abb. 5).

Ein Vergleich der in Abb. 5 dargestellten Meßwerte unterstreicht zumindest für kleinere Akzeptor-Konzentrationen die wesentlich höheren Einbauraten von Isocitrat-Wasserstoff gegenüber den beiden Steroid-Donatoren. Andererseits stellt 5α -Androstan- 3β -ol- 17α -ol- 3α -T mehr Tritium als Methenolon zur Sättigung der Doppelbindung im A-Ring zur Verfügung. Der bevorzugte Tritium-Einbau aus der 3α -Stellung ist bei kleinen Akzeptor-Konzentrationen etwa 2 bis 3 mal größer als beim Methenolon. Im etwa gleichen

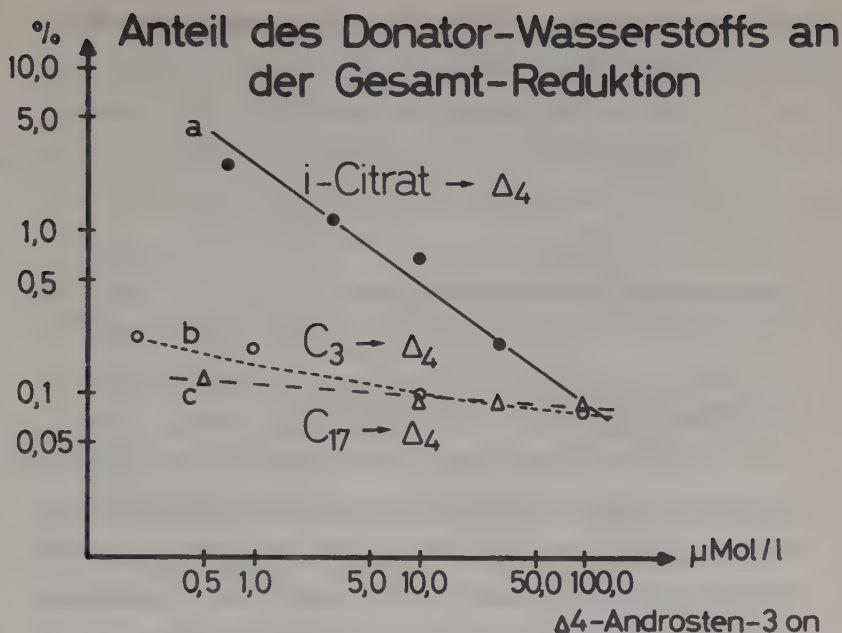


Abb. 5

=====

Anteil des Donator-Wasserstoffs an der Gesamtreduktion von Δ_4 -Androsten-3-on

Bestimmung der spez. Aktivität ($\mu\text{Ci T}/\mu\text{Mol}$) des Androstan-3-ol nach Inkubation mit verschiedenen Tritium-Donatoren. Zusammensetzung der Ansätze s. Methodik. Die erhaltenen Meßpunkte sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

Abzisse : $\mu\text{Mol/l}$ Δ_4 -Androsten-3-on

Ordinate : spez. Akt. des gebildeten Androstan-3-ol in $\mu\text{Ci T}/\mu\text{Mol}$ bezogen auf die spez. Akt. des Donators in %.

Es bedeuten:

a) i-Cit- Δ_4	Isocitrat-2-T	Δ_4 -Androsten-3-on
b) $C_3 - \Delta_4$	5 α -Androstan-3 β ol-17on-3 Δ_4 T	"
c) $C_{17} - \Delta_4$	Methenolon-17 Δ_4 -T	"

Verhältnis überträgt Isocitrat-2-T mehr Wasserstoff als 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T.

Diskussion der Versuchsergebnisse =====

Wasserstoff-Transfer auf Position C₁₇

Abb. 3 zeigt einen bevorzugten Wasserstoff-Transfer von der tritierten Position des Methenolons in die Position 17 des angebotenen Steroid-Akzeptors. Dieser Wasserstoff-Transfer verläuft bei kleinen Akzeptor-Konzentrationen oder großem [Donator] / [Akzeptor] Verhältnis fast vollständig - d.h. jedes Wasserstoffatom, das durch die Oxydation des Methenolon-17 α -T frei wird, erscheint im vorliegenden Akzeptor (Östron). Es muß somit eine unmittelbare Nachbarschaft des Akzeptor- und Donator-oxydierenden bzw. reduzierenden Enzym-Systems bestehen; möglicherweise sind beide Enzyme identisch. Mit steigender Östron-Konzentration entsteht ein immer größerer Bedarf an Reduktionsäquivalenten, der durch Oxydation des Donators nicht gedeckt werden kann. Damit sinkt der Tritium-Anteil im gebildeten Östradiol - und somit die relative spezifische Aktivität. Diese Aktivitätsabnahme mit steigender Akzeptor-Konzentration ist für derartige Reaktionen charakteristisch (s. Schema Seite 30).

So liegen für die Umsetzung von 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T und Isocitrat-2-T mit Östron ähnliche

Abhängigkeiten vor. In beiden Fällen werden tritiumbeladene Coenzyme durch Diffusion oder über eine Enzym-Kette zur 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase geschleust und dort zur Reduktion von Östron eingesetzt. Bei einem Donator-Überschuß, d.h. bei sehr kleinen Akzeptor-Konzentrationen, wird das Reaktionsmedium mit markierten Pyridinnucleotiden überschwemmt und infolge der geringen umzusetzenden Östronmenge ein relativ guter Tritium-Einbau erzielt. Sobald jedoch die Akzeptor-Konzentrationen steigen, sinkt durch die damit gekoppelte Umsatzgeschwindigkeit bei steigendem Coenzym-Verbrauch die relative spezifische Aktivität.

Die Forderung nach einer guten, spezifischen Wasserstoff-Übertragung scheint demnach in einem Gleichklang der Umsatzgeschwindigkeiten von Akzeptor- und Donator-Enzymsystem und einer räumlichen Nachbarschaft beider Dehydrogenasen zu liegen. So wird Isocitrat schnell verstoffwechselt, und damit werden nur kurzzeitig markierte Pyridinnucleotide zur Verfügung gestellt. Ein guter Wasserstoff-Transfer ist deshalb nur mit geringen Östron-Konzentrationen zu erzielen; bei größeren Östronmengen, die über längere Zeiten umgesetzt werden, sinkt deshalb der Tritium-Einbau schnell.

Obwohl der Kurvenverlauf für 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T ähnlich ist, liegt hier eine andere Ursache für die geringe Effektivität des Tritium-Transfers vor. In weiblicher Rattenleber ist die Aktivität der 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase gering (45,47), sodaß eingesetztes 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T nur langsam an C₃ oxydiert wird. Während pro Zeiteinheit wenig markierte Coenzyme gebildet werden, reduziert die 17 β -Hydroxysteroid-

Dehydrogenase Östron mit großer Geschwindigkeit. Diese Divergenz der Umsatzgeschwindigkeiten - einschließlich einer möglichen räumlichen Entfernung beider Dehydrogenasen - führt zwangsläufig zu einem geringen Tritium-Einbau in Östradiol.

Aus Untersuchungen mit der 20 β -Hydroxy-steroid-Dehydrogenase (47,48) ist bekannt, daß dieses Enzym nur in geringem Umfang 20-Hydroxy-Gruppen zu oxydieren vermag, wobei die Aktivität der Dehydrogenase in der Leber männlicher Ratten größer als bei weiblichen Tieren ist. So führen Inkubationsversuche zu einer schon beschriebenen Divergenz zwischen Donator- (20 β -Hydroxysteroid) und Akzeptor-Enzymaktivität (17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase), die wiederum zu geringen Tritium-Einbauraten in Östradiol führt. Die nach der Umsetzung ermittelten HTO-Ausbeuten betragen etwa 2,5 % und bestätigen damit die geringe Oxydationsrate des Tritium-Donators.

Wasserstoff-Transfer auf Position C₃

Aus den im vorangegangenen Abschnitt entwickelten Vorstellungen über einen optimalen Wasserstoff-Transfer waren für die Umsetzung des 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T mit dem Akzeptor 4₄-Androsten-3-on ähnlich günstige Verhältnisse zu erwarten wie im Falle des Methenolon/Östron. 4₄-Androsten-3-on war deshalb ein idealer Akzeptor, weil beim Vorliegen einer Hydroxy-Gruppe eindeutig der Ort des Tritium-Einbaus angegeben werden konnte. Nach Untersuchungen von Rongone (49) und Mützel (50) wird 4₄-Androsten-3-on trotz fehlender 17-Keto-Gruppe ähnlich schnell wie

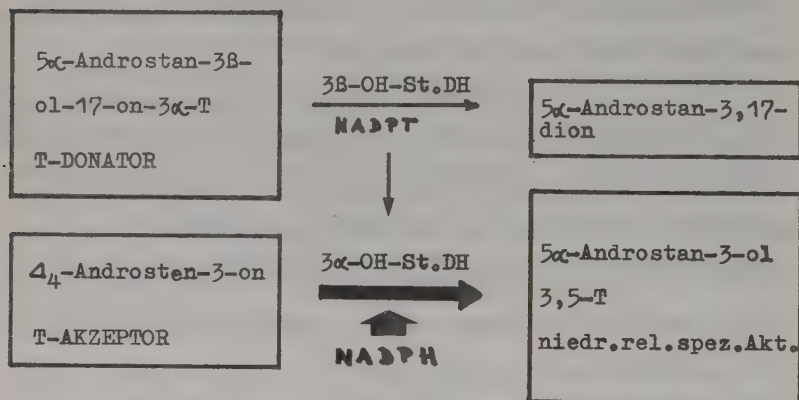
Δ_4 -Androstendion reduziert.

Ein Blick auf die in Abb. 4 dargestellten Versuchsergebnisse vermittelt jedoch ein vollkommen anderes Bild. Zunächst zeigt sich eine vergleichsweise gute Einbaurrate von Isocitrat-Wasserstoff in den Akzeptor. Bei einer Gegenüberstellung mit den Tritium-Einbauraten des Isocitrats in den Akzeptor Östron (Abb. 3) ergeben sich jedoch nur unerhebliche Unterschiede. Die Effektivität des Wasserstoff-Donators Isocitrat ist bei einer Änderung des Wasserstoff-Akzeptors gleich geblieben. Die Ursache der starken Änderung des Isocitratwasserstoff-Einbaus bei verschiedenen Akzeptor-Konzentrationen wurde bereits diskutiert.

Wird Isocitrat gegen Methenolon- 17α -T oder 5α -Androstan- 3β -ol- 17α - 3α -T ausgetauscht, sinkt der relative Tritium-Einbau in den Akzeptor. Enttäuschend waren besonders die Ergebnisse der Wasserstoff-Übertragung von 5α -Androstan- 3β -ol- 17α - 3α -T auf die 3 -Keto-Gruppe von Δ_4 -Androsten- 3α -on. Entgegen unserer Erwartung stieg die relative spezifische Aktivität selbst bei kleinen Akzeptor-Konzentrationen nicht über 1 %. Auffällig war zunächst die geringe Metabolisierung des tritierten Steroids in weiblichem Rattenleberhomogenat. Auch die HTO-Ausbeute - ein Maß der Oxydation des an C_3 markierten Steroids - lag mit 2,5 % nach 10 Minuten Inkubationsdauer etwa um das 10-fache tiefer als bei entsprechend markierten 17 -Steroiden. So gesehen, war durch die geringe Aktivität der 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase in Rattenweibchen nur im ungenügenden Ausmaß markiertes Pyridinnucleotid zu erwarten, das seinerseits mit Hilfe des gleichen Enzyms in den Akzeptor eingebaut

werden konnte.

Der Akzeptor (Δ_4 -Androsten-3-on) wird gleichzeitig durch die in weiblichen Ratten wesentlich effektivere 3α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (45,47) schnell reduziert. Wegen der unzureichenden Leistung der 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase werden nicht markierte, reduzierte Coenzyme größtenteils aus dem umgebenden Reaktionsmedium herangezogen. Das führt zwangsläufig zu einer geringen spezifischen Aktivität des entstehenden Akzeptormetaboliten (s. folgendes Schema).



Da nach Literatur die Aktivität der 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase in der Leber männlicher Ratten erheblich größer ist, wurde in einem Doppelversuch 5α -Androstan- 3β -ol-17-on- 3α -T mit männlichem Leberhomogenat umgesetzt (Abb. 6). Zunächst fällt die intensivere Bildung von Androstandiol auf, gleichzeitig stieg die HTO-Ausbeute auf 21,8 % an. Das bedeutet einen etwa 15-fachen Anstieg gegenüber Versuchen mit weiblichem Rattenleberhomogenat.

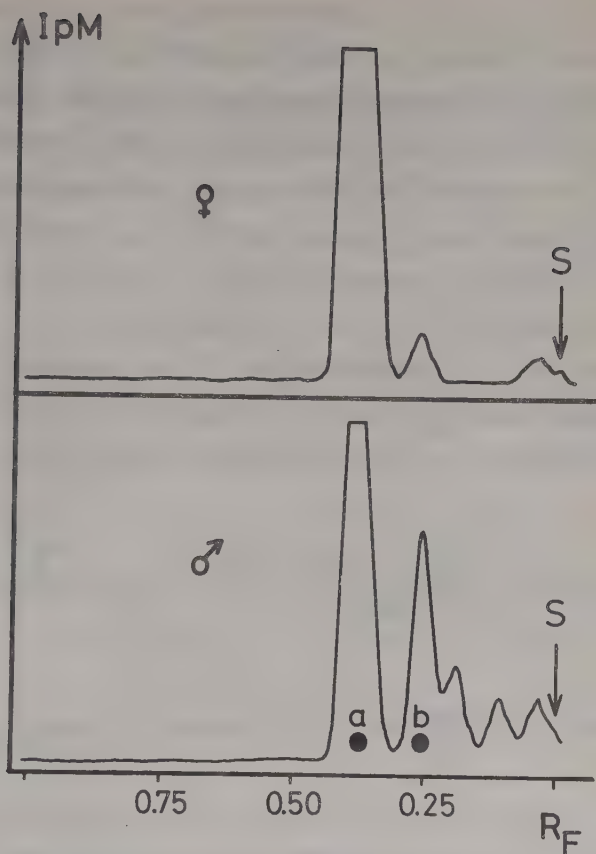


Abb. 6

=====

Metabolisierung von 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T in vitro

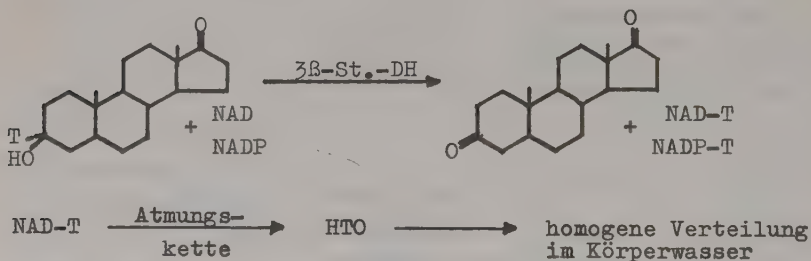
5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T wurde mit Leberhomogenat männlicher (♂) und weiblicher (♀) Ratten inkubiert. Ein Teil des Inkubationsansatzes wurde nach Aufarbeitung dünn-schichtchromatographisch getrennt (s. Methodik).

a : 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T

b : 5 α -Androstan-3 β ,17 β -diol

Laufmittelsystem: Chloroform/Aceton 9 : 1

Gleichzeitig wurde bei Ratten in einem in-vivo Versuch die Oxydationsgeschwindigkeit des 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T gemessen. Den Tieren wurden 10 μ Ci = 4,6 μ g/kg Ratte tritiiertes Steroid intramuskulär injiziert und anschließend die HTO-Ausbeute im Atemwasser nach einem von unserer Arbeitsgruppe entwickelten Verfahren (51,52) über die Zeit gemessen (s. Abb. 7). Da pro Mol HTO im Körperwasser ein Mol Steroid oxydiert worden ist, muß der Anstieg der spezifischen Aktivität im Atemwasser (μ Ci/ml Körperwasser-Destillat) ein Äquivalent der fortlaufenden Oxydation des tritiierten Steroids sein (näheres s. Methodik).



Durch diese Methode konnte die geschlechtsspezifische Enzymaktivität der 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase auch unter in-vivo Bedingungen nachgewiesen werden.

Aus diesen Ergebnissen war zu entnehmen, daß durch gesteigerte Aktivität der 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase in männlichen Ratten mehr tritiiertes Substrat umgesetzt und damit mehr tritierte Pyridinnucleotide entstehen und letztlich deshalb ein besserer Wasserstoff-Transfer in die 3-Keto-Gruppe von Δ_4 -Androsten-3-on als Akzeptor zu erwarten war. Die Ergebnisse dieser Versuche entsprachen

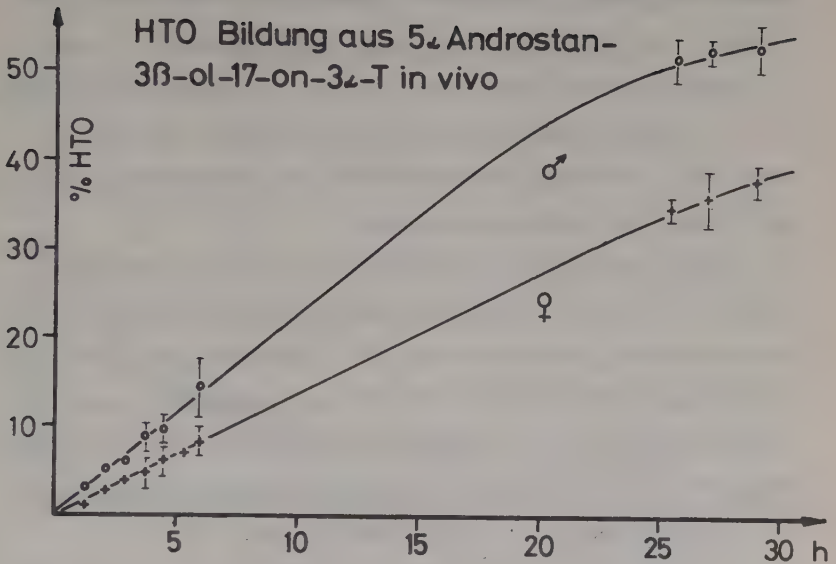


Abb. 7

=====

Oxydation von 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T in-vivo

Männlichen (♂) und weiblichen (♀) Ratten wurden 10 μ Ci = 4,6 μ g/kg 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T i.m. injiziert und die HTO-Bildung im Körperwasser (s. Methodik) bestimmt.

Ordinate : HTO-Konzentration im Körperwasser, bezogen auf die injizierte Steroidaktivität ($\rightarrow$ 100 %).

allerdings nicht unseren Erwartungen. Wie aus Abb. 8 zu entnehmen ist, sind die Werte der bestimmten relativen spezifischen Aktivitäten ähnlich denen entsprechender Versuche mit Leberhomogenat weiblicher Tiere. Im Gegensatz dazu lag die im Inkubationsansatz gebildete HTO-Menge mit 22,6 % etwa um das 6-fache über den Werten der Versuchsansätze mit weiblichem Rattenleberhomogenat.

Wir leiten aus diesen Ergebnissen die mögliche Existenz mehrerer - in ihren Aufgaben jedoch streng geteilter - β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen ab. Offensichtlich ist eines dieser Enzyme nur für die HTO-Bildung verantwortlich, ein anderes vermittelt den Wasserstoff-Austausch zwischen den Steroiden und ist vielleicht damit überhaupt zuständig für die Syntheseleistung im Zellkompartiment.

So konnte auch Hieronimus (53) durch Inkubation von Östradiol- 17α -T und Δ_3 -Androsten-17-on mit Uteri vorbehandelter Ratten (mehrmalige Gabe von inaktivem Östradiol) eine gegenüber Kontrollversuchen (unvorbehandelte Tiere) stark erhöhte Oxydationsrate von Östradiol zu Östron feststellen, wobei der Anteil des zur Reduktion von Δ_3 -Androsten-17-on verwendeten Wasserstoffs konstant geblieben war.

Dieses Ergebnis ist nur durch die Anwesenheit gleicher, in ihren Aufgaben jedoch begrenzter Steroid-Dehydrogenasen zu erklären, die unter verändertem Milieu einzeln aktivierbar sind.

Anteil des Donator-Wasserstoffs an der Gesamt-Reduktion

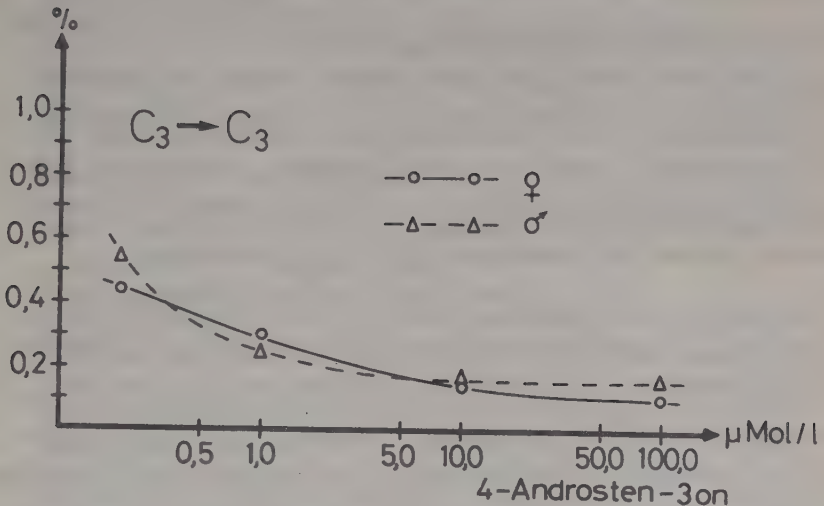


Abb. 8

=====

Anteil des Donator-Wasserstoffs an der Gesamtreduktion von Δ_4 -Androsten-3-on

Bestimmung der spez. Aktivität ($\mu\text{Ci T}/\mu\text{Mol}$) des Androstan-3-ol nach Inkubation mit 5Δ -Androstan-3 β -ol-17-on-3 Δ -T als Tritium-Donator in Leberhomogenat männlicher (σ) und weiblicher (φ) Ratten.

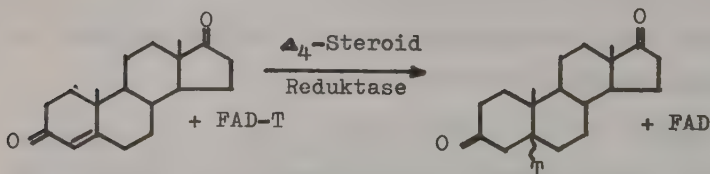
Ordinate : spez. Aktivität des Androstan-3-ol bezogen auf die spez. Aktivität des Donators ($\hat{=}$ 100%).

Abzisse : Konzentration des Tritium-Akzeptors in $\mu\text{Mol/l}$.

Enzymatische Wasserstoff-Übertragung auf die Δ_4 -Doppelbindung

Die Wasserstoff- und damit Tritium-Übertragung von 3- und 17-markierten Steroiden in den A-Ring eines Akzeptor-Steroids mittels der Δ_4 -Steroid-Reduktase war ein besonders reizvoller Punkt dieser Arbeit. Der Nachweis einer derartigen Übertragung war uns in Leberschnitten und Leberhomogenat bisher noch nicht gelungen, zum anderen hatten wir abgesehen von Glucose-1-T und Mikrosomen als Enzymquelle keinen Tritium-Donator für die Δ_4 -Reduktase.

Obwohl nach den Untersuchungen von Tomkins (18) wahrscheinlich war, daß nur NADPH als Coenzym der Δ_4 -Reduktase in Frage kommt, diskutiert er in seiner Arbeit auch FAD* als mögliches Coenzym. Zunächst sollte daher mit markierter Bernsteinsäure als Tritium-Donator geklärt werden, ob FAD, das Coenzym der Succinat-Oxydase, in seiner reduzierten Form für die Δ_4 -Steroid-Reduktase ein akzeptabler Wasserstoff-Donator etwa nach folgendem Schema ist:



Wir fanden überraschenderweise nach der Aufarbeitung des entsprechenden Inkubationsansatzes markierte Androstandione. Eine gleichzeitig durchgeführte Inkubation von Bernstein-

* FAD : Flavin-adenin-dinucleotid

säure-2,3-T mit weiblichem Rattenleberhomogenat und anschließender Abtrennung der Pyridinnucleotide (s. Abb. 2) ergab eindeutig die Existenz von Tritium-markierten Triphosphopyridinnucleotiden.

Wir erklären uns diese Befunde zunächst durch die enzymatische Umwandlung der Bernsteinsäure in Isocitrat gemäß Schema Seite 23. Als wir anschließend die Versuchsserie mit radioaktivem Isocitrat wiederholten, konnte ein verstärkter Tritium-Einbau in die Position 5 von Androstandion gemessen werden.

Mit Isocitrat hatten wir einen Reaktionspartner gewonnen, der auch durch seine überragende Bedeutung im intermediären Zellstoffwechsel (Citratcyclus) als Wasserstoff-Lieferant der Δ_4 -Steroid-Reduktase zu diskutieren wäre. Denn trotz des relativ geringen Wasserstoff-Einbaus in Steroid-Akzeptoren müssen, um die Rolle des Isocitrats voll zu würdigen, drei Faktoren berücksichtigt werden:

1. Die Einbauraten sind wesentlich höher anzusetzen, da wir mit tritiiertem D- und L-Isocitrat inkubiert haben, die biologisch nicht gleichwertig sind (s. Seite 15).
2. Nur der Teil des Isocitrats steht für Steroid-Reduktionen zur Verfügung, der im extramitochondrialen Raum umgesetzt wird.
3. Die unterschiedliche Aktivität von Akzeptor- (Steroid) und Donator- (Isocitrat) Enzymsystem führt zu einer schnellen Oxydation von Isocitrat zu HTO, sodaß die langsamer verlaufende Ring-A Reduktion weniger NADP-T zur Verfügung gestellt bekommt.

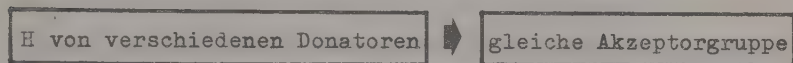
Die Versuchsergebnisse sind in Abb. 4 zusammengefaßt. Ein Vergleich mit Abb. 3 zeigt eine gewisse Ähnlichkeit mit der besprochenen Reduktion der 3-Keto-Gruppe durch Isocitrat.

Abb. 4 bestätigt - besonders im Bereich kleiner Akzeptor-Konzentrationen - den überlegenen Tritium-Transfer des Isocitrat-Wasserstoffs in den A-Ring des Steroidmoleküls. Dies war zu erwarten, da das Coenzym der Δ_4 -Reduktase und der Isocitrat-Dehydrogenase identisch ist.

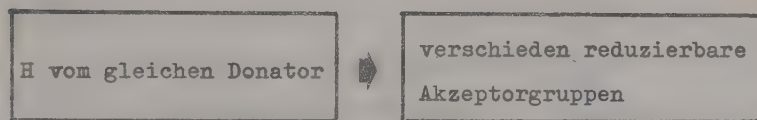
Mit Verwunderung haben wir dagegen den Tritium-Einbau in den A-Ring von Δ_4 -Androsten-3-on nach Inkubation mit Methenolon-17 α -T registriert. Unter besonderen Umständen kann Tritium (oder Wasserstoff) aus Steroid-Hydroxygruppen auf alle funktionellen Gruppen von Steroid-Akzeptoren übertragen werden. Aber Voraussetzung für einen derartigen Austausch von C₁₇ nach Δ_4 scheint zu sein, daß das Akzeptor-Steroid selbst keine 17-Keto-Gruppe enthält. Denn wie wir aus Abb. 2 wissen, wird ein sehr großer Teil des dort angebotenen Wasserstoffs durch eine 17-Akzeptor-Gruppe selbst abgefangen. Zusätzlich wird die räumliche Entfernung der beiden Enzymsysteme einen zufriedenstellenden Wasserstoff-Transfer erschweren.

Weniger schwierig scheint dagegen der Tritium- und damit Wasserstoff-Transfer aus der 3-Keto-Gruppe in die Position 5 eines Akzeptor-Steroids zu sein. Nach der von mir untersuchten Umsetzung des 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T mit Δ_4 -Androsten-3-on ist trotz der Anwesenheit einer 3-Keto-Gruppe im Akzeptor ein Tritium-Einbau an der Doppelbindung zu beobachten.

Im vorangegangenen Abschnitt haben wir die Wirksamkeit verschieden tritierter Donatoren bei der Reduktion einer reduzierbaren Akzeptorgruppe untersucht:



Wird dieses Verfahren nach folgendem Schema abgewandelt,



so ergeben sich interessante Aussagen über die Verteilung des Donator-Wasserstoffs auf bestimmte Positionen im Steroid-Akzeptor.

In Abb. 9 (s. Seite 54, oberer Teil) wurde unter diesem Gesichtspunkt der Tritium-Übergang aus der Position 17 eines Donatormoleküls (Methenolon-17 Δ -T) in die Positionen 3, 17 und Δ_4 (Östron und Δ_4 -Androsten-3-on) für eine einheitliche Akzeptor-Konzentration (1 μ Mol/l) aus den Abbildungen 3, 4 und 5 zusammengestellt. Hier wird die bereits diskutierte Überlegenheit der Wasserstoff-Übertragung zwischen 17-Hydroxy- und 17-Keto-Gruppen von Steroiden besonders deutlich. Reduzierte Coenzyme der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase werden um den Faktor 100 weniger zur Reduktion der 3-Keto-Gruppe und der Δ_4 -Doppelbindung verwendet. Dies entspricht den Ergebnissen, wie sie bei dem Tritium-Transfer von Cortisol-11 Δ -T auf die 17-Keto-Gruppe des Östrons gefunden wurden.

Anteil des Donatorwasserstoffs an der Reduktion im Steroid-Molekül

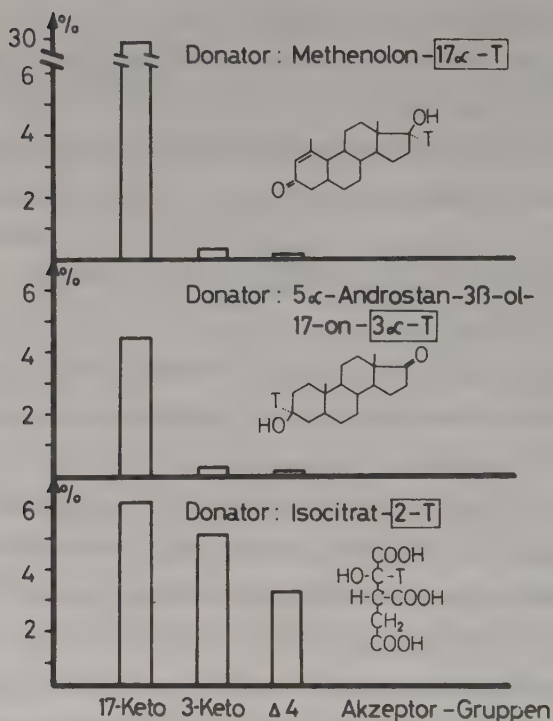


Abb. 9

=====

Spezifische Aktivitäten ($\mu\text{Ci T}/\mu\text{Mol}$) verschiedener Steroid-Akzeptor-Gruppen nach Inkubation mit 3 tritierten Wasserstoff-Donatoren

Abzisse : Wasserstoff-Akzeptoren ($1 \mu\text{Mol/l}$)

C_{17} = Keto-Gruppe des Östrons

C_3 und Δ_4 = Keto-Gruppe und Ring-A Doppelbindung von Δ_4 -Androsten-3-on

Ordinate: s. Legende Abb. 8

Ein ähnlicher, bevorzugter Wasserstoff-Transfer zwischen gleichen Positionen von Akzeptor- und Donator-Steroid liegt bei Redoxreaktionen an C₃ nicht vor (s. Abb. 9, mittlerer Teil). So wird hier etwa 10 mal mehr Wasserstoff in die 17-Keto-Gruppe des Östrons eingebaut als in die 3-Keto-Gruppe von Δ_4 -Androsten-3-on. Dieser scheinbare Widerspruch erklärt sich für weibliche Ratten folgendermaßen:

Bei Oxydoreduktionen von 3-Keto-Steroiden konkurrieren 2 Enzyme: die 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase und das entsprechende 3 β -Analogon, um das Substrat. Bei Rattenweibchen wird ein angebotener Akzeptor durch die aktivere 3 α -Dehydrogenase schnell reduziert, während 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T durch die "langsamere" 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase oxydiert wird. Damit bilden sich nur geringe Mengen an triitierten Pyridinnucleotiden, was nach Schema S. 44 zu einer kleinen relativen spezifischen Aktivität im Akzeptor-Metaboliten führt. Eine derartige Konkurrenz scheidet bei einem Angebot von 17-Keto-Steroiden aus, sodaß ein besserer Tritium-Einbau in Östron zu beobachten ist.

Wie zu erwarten war, zeigt der Tritium-Einbau aus Isocitrat-2-T in bestimmte Positionen des Steroidgerüsts kaum Unterschiede (s. Abb. 9, unterer Teil). Markierte Coenzyme der Isocitrat-Dehydrogenase werden im gleichen Maße zur Reduktion der Keto-Gruppen und der Δ_4 -Doppelbindung verwendet. Diese Tatsache ist deshalb von Bedeutung, weil sich Isocitrat in dieser Beziehung nicht wie andere hydrophile Substrate des Zellstoffwechsels verhält. Wie schon erwähnt, entsteht z.B. aus Glucose-1-T unter gleichen

Bedingungen (Konzentrationen, Enzymquelle) tritiiertes NADPH, aber es bilden sich keine tritiierten Steroid-Metabolite.

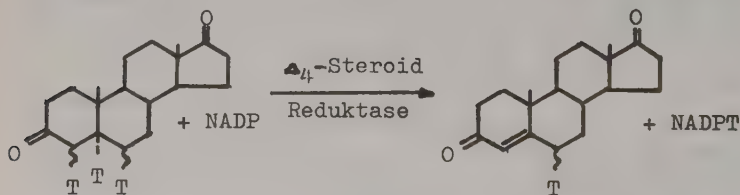
Der Tritium-Einbau in Östradiol bei Anwesenheit von 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T bzw. 20 β -Hydroxy-progesteron-20 α -T ist wesentlich geringer als in Gegenwart von Methenolon-17 α -T (s. Abb. 3, Seite 33). Da sich im gleichen Verhältnis auch die HTO-Ausbeuten ändern, wurde in folgender Tabelle der Tritium-Einbau in Östradiol verglichen mit der bei diesen Versuchen gebildeten HTO-Menge (29). Dadurch wird die Effektivität des Tritium-Einbaus aus verschiedenen tritiummarkierten Substraten in Östradiol besser miteinander vergleichbar.

Vergleich des Tritium-Einbaus in Östradiol (Tritium-Akzeptor) im Verhältnis zur HTO-Bildung (Reaktionsbedingungen s. Legende Abb. 3)

T-Donator 1 μ Mol/l	HTO in %	$Q = \frac{\text{rel.spez.Aktiv. in \%}}{\% \text{ HTO}}$
Methenolon-17 α -T	18,1	1,6
5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T	2,5	1,5
20 β -Hydroxy-progesteron-20 α -T	1,6	0,81
Isocitrat-2-T	73,0	0,075

Obwohl nach Untersuchungen von Tomkins (22) die Bildung eines im A-Ring ungesättigten Steroids aus seiner Dihydroverbindung nicht möglich sein soll, ist immer wieder die Frage der Reversibilität der Δ_4 -Reduktase diskutiert worden (22). Außerdem beschäftigte uns ein damit zusammenhängendes Problem: Testosteron, als eigentliches androgenes Sexualhormon, wird im Prostata-Gewebe als Dihydrotestosteron gespeichert, wobei seine androgene Wirkung gegenüber Testosteron um den Faktor 100 ansteigt (23).

Eine der bisher unbeantworteten Fragen ist, ob dieses Dihydrotestosteron im Prostata-Gewebe die eigentlich wirksame androgene Komponente ist oder nur eine Speicherform des Testosterons darstellt. Wenn die letztere Hypothese zutrifft, muß Dihydrotestosteron enzymatisch zu Testosteron dehydrierbar sein und damit eine Injektion von 5α -Dihydrotestosteron oder 5α -Androstandion-4,5,6-T in männlichen Ratten nach folgendem Schema zur Bildung von tritiiertem Wasser führen.



NADP-T $\longrightarrow$ NAD-T $\longrightarrow$ Atmungskette $\longrightarrow$ HTO

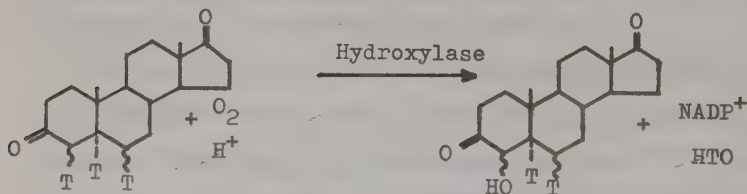
Bestimmung des labilen (a) und enolisierbaren (b) Tritiumanteils in 5 α -Androstandion-4,5,6-T				
HTO-Bildung in % der eingesetzten Aktivität				Methodik
a				
im pH-Bereich				15 min Inkubation (37°) mit Puffer; Bestimmung der HTO-Bildg. durch Gefrierdestillation
6,7-10,8		0,1 %		
b				
mit ätha-	30,8	35,3	31,1	s. Lit. (36) Formel-
nol. KOH	32,8			schema S. 65; Bestimmung
	$\bar{x}$ = 32,5 %			des HTO-Anteils durch Gefrierdestillation

Wir waren davon überzeugt, daß falls die Doppelbindung enzymatisch in den A-Ring eingeführt wird, es uns gelingen muß, das dabei freiwerdende Tritium (laut Schema S. 57) in einem zugegebenen Steroid-Akzeptor nachweisen zu können. Wir verwendeten zur besseren Identifizierung ^{14}C -markiertes Östron und Progesteron als Wasserstoff-Akzeptor. Die interessierenden Metabolite (Östradiol und Pregnandion) wurden nach dünnschichtchromatographischer Reinigung durch eine radioaktive Verdünnungsanalyse auf ein konstantes $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis überprüft, das aber nicht

gemessen werden konnte. Somit kann nicht auf eine Tritium-Übertragung im oben erwünschten Sinne geschlossen werden.

Bei den in-vivo Untersuchungen mit 5 α -Androstandion-4,5,6-T zeigte sich eine Verstoffwechselung unter HTO-Bildung (s. Abb. 10), wobei die HTO-Ausbeuten bei männlichen und weiblichen Tieren stark unterschiedlich waren. So wurden in weiblichen Ratten nach 5 Stunden etwa 5 %, in männlichen Tieren dagegen 61 % des injizierten Steroids metabolisiert. Daß 5 α -Androstandion-4,5,6-T unter physiologischen Bedingungen kein labiles Tritium enthält, war in mehreren Kontrollversuchen bei pH-Werten von 6,7-10,8 überprüft worden (s. Tabelle S. 59).

Da der fehlende Tritium-Transfer auf Akzeptor-Steroide eine intermediäre NAD-T/NADP-T-Bildung aus Androstandion-4,5,6-T ausschloß, war die HTO-Bildung unserer in-vivo Befunde nur über eine Hydroxylierung des Steroids zu erklären.



Es wurde daher versucht, durch die folgenden Experimente einen Beweis für die HTO-Bildung durch Hydroxylasen zu erbringen.

Es muß erwähnt werden, daß über eine Hydroxylierung am Kohlenstoffatom 4 von Androgenen bisher nichts berichtet wurde.

Lediglich Hecker et al. (25) beschrieben

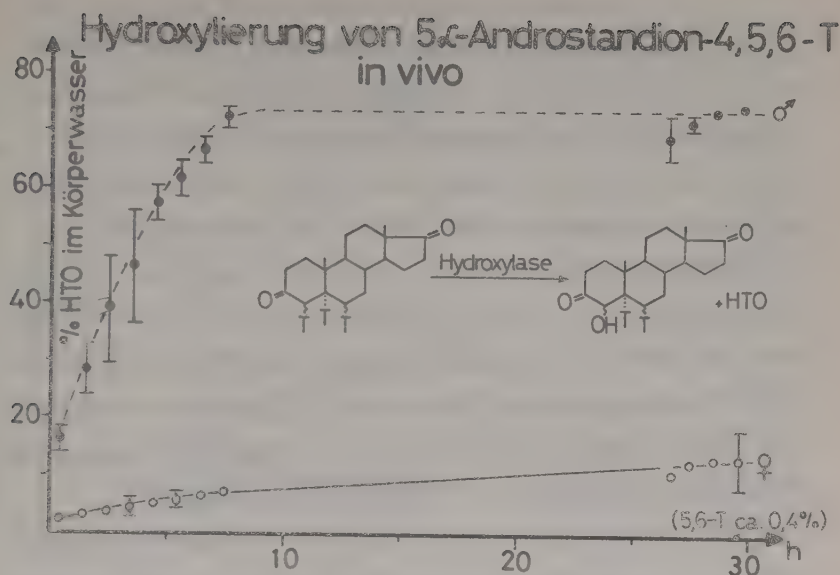


Abb. 10

=====

Zeitabhängigkeit der HTO-Bildung von 5 α -Androstandion-4,5,6-T nach Injektion in Ratten

Den männlichen (♂) und weiblichen (♀) Ratten wurden 12 μ Ci = 2,8 μ g/kg 5 α -Androstandion-4,5,6-T i.m. injiziert. Die erhaltenen Meßpunkte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Ordinate: HTO-Konzentration im Körperwasser bezogen auf die injizierte Steroidaktivität ($\cong$ 100 %).

eine 4-Hydroxylierung des Östradiols durch
Rattenlebermikrosomen.

Ein sicherer Beweis für die HTO-Bildung durch Hydroxylierung ergab sich aus folgender Überlegung: Hydroxylasen (hauptsächlich in der Leber lokalisiert) können nur unter aeroben Bedingungen wirksam werden (s. Schema S. 60). Im folgenden Versuch inkubierten wir deshalb männliches Rattenleberhomogenat einmal unter aeroben und ein zweites Mal unter anaeroben Bedingungen (s. Abb. 11). Während unter anaeroben Bedingungen die HTO-Ausbeute wie erwartet nur wenig über dem Blindwert lag, stieg unter aeroben Bedingungen die HTO-Ausbeute linear über die Zeit an (s. Legende).

Auch die HTO-Bildung in-vivo scheint auf einer Hydroxylierung an C₄ zu beruhen, wie der Einfluß des Hydroxylierungs-Inhibitors Metopiron zeigt. In Abb. 14 wird der Einfluß von Metopiron und Cyproteronacetat, in Dosen von 50 mg/kg bzw. 6 mg/kg Ratte, auf die HTO-Bildung aus tritiiertem 5 α -Androstandion-4,5,6-T dargestellt. Während 5 Stunden nach Injektion in nicht vorbehandelten Tieren 60 % der injizierten Aktivität als HTO vorliegt, sinken die Werte nach Vorbehandlung mit Metopiron auf 18 % und nach Gabe von Cyproteronacetat auf 10 % ab. In einem Kontrollversuch mit Östradiol-2,4,6,7-T hemmt Metopiron ebenfalls die Hydroxylierung von Östradiol. Eine Dosis von 6 mg/kg Cyproteronacetat hat dagegen keinen Einfluß auf die Hydroxylierungsrate von Östradiol.

Uns interessierte im folgenden Versuch, welches Tritium-Atom des an 3 Stellen markierten Steroids durch die Umsetzung im Organismus labilisiert wird. Wir

Hydroxylierung von 5 α -Androstandion-4,5,6-T in vitro

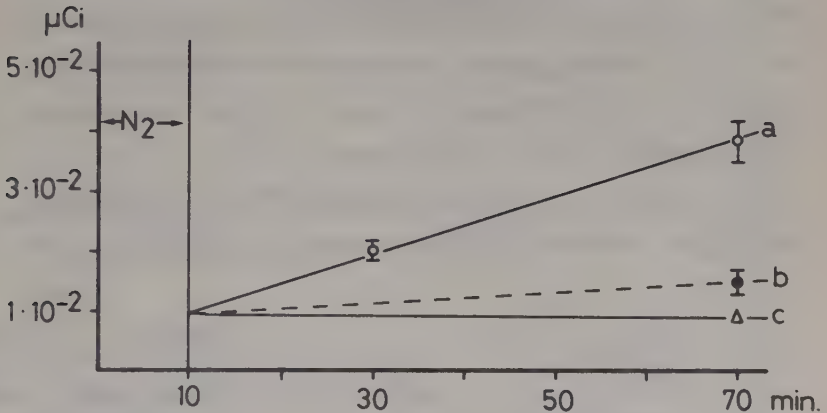


Abb. 11

=====

Hydroxylierungsgeschwindigkeit von 5 α -Androstandion-4,5,6-T in Rattenleberhomogenat männlicher Ratten unter aeroben und anaeroben Bedingungen

Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde durch Bestimmung des radioaktiven Wassers (Gefrierdestillation, s. Methodik) ermittelt.

Versuchsansätze:

- 1 ml Leberhomogenat-Suspension $\pm$ 200 mg Leber ♂
- 3 ml TRIS/HCl-Puffer pH = 7,4
- 6,7 μ Ci 5 α -Androstandion-4,5,6-T in
- 0,1 ml Propylenglycol

Alle Ansätze wurden 10 min vorbegast (95 % N₂/5% CO₂); die Reaktion wurde durch Vereinigung mit dem Steroid gestartet. Ein Teil der Proben wurde nun aerob (a) weiter inkubiert, der Rest anaerob (b).

Kontrolle: Puffer statt Leberhomogenat.

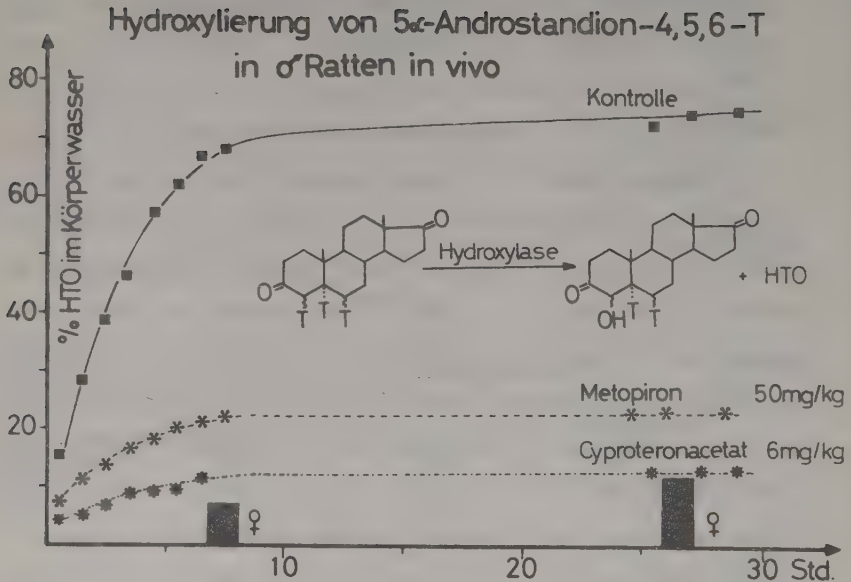


Abb. 14

=====

Einfluß von Cyproteronacetat und Metopiron auf die Hydroxylierung von 5 α -Androstandion-4,5,6-T in männlichen Ratten

Injizierte Aktivität: 9,5 μ Ci = 2,6 μ g/kg

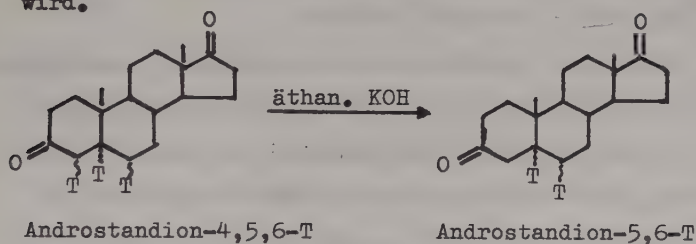
Vorbehandlung : den Ratten wurden 18, 15, 13 und 2 Stunden vor Versuchsbeginn je 10 mg/kg Metopiron appliziert. Die Injektion des radioaktiven Steroids war nochmals mit der Gabe von 10 mg/kg Metopiron gekoppelt.

Cyproteronacetat wurde gleichzeitig mit dem Steroid in einer äthanolischen Lösung injiziert.

Ordinate: HTO-Konzentration im Körperwasser bezogen auf die injizierte Steroidaktivität (♣ 100 %)

entfernten deshalb durch Enolisierung (36) (s. Schema S.59) das Tritium am Kohlenstoffatom 4 und injizierten das so gewonnene 5 Δ -Androstandion-5,6-T männlichen und weiblichen Ratten. Bei der anschließenden Aktivitätsbestimmung im Körperwasserdestillat (Atemwasser) konnte maximal 0,45 % der eingesetzten Aktivität als Tritiumwasser errechnet werden.

In Zusammenhang mit den vorangegangenen Versuchen war damit erwiesen, daß das am C-Atom 4 gebundene Tritium durch Hydroxylierung enzymatisch labilisiert wird.



Diskussion der Versuche mit Androstandion-4,5,6-T

Frühere Arbeiten über das irreversible Verhalten der Δ_4 -Reduktase können anhand der oben erwähnten Versuchsergebnisse bestätigt werden. So gelang es uns nicht, durch Inkubation von 5 Δ -Androstandion-4,5,6-T mit Steroid-Akzeptoren einen Tritium- und damit Wasserstoff-Transfer zu erreichen und damit eine Reversibilität der Δ_4 -Reduktase nachzuweisen.

Die durch in-vivo und in-vitro Versuche gemessenen HTO-Ausbeuten lassen auf eine geschlechtsspezifische Hydroxylierung des tritierten Androstandions schließen. In männlichen Ratten werden in 5 Stunden 60 %, in weiblichen Tieren dagegen

weniger als ein Zehntel dieser HTO-Menge gebildet. Wir führen die HTO-Bildung aus zwei Gründen auf eine neue, in der Literatur bisher nicht beschriebene 4-Hydroxylase zurück:

1. Eine Inkubation unter anaeroben Bedingungen führt zu keiner HTO-Bildung aus dem Steroid.
2. In-vivo Versuche mit Metopiron-vorbehandelten, männlichen Ratten ergaben eine drastische Senkung der gebildeten HTO-Menge (in Übereinstimmung mit bisher in der Literatur beschriebenen Versuchen wird die Aktivität der Hydroxylasen durch Metopiron gehemmt).

Außerdem führt eine Injektion von enolisiertem 5 Δ -Androstandion (5 Δ -Androstandion-4,5,6-T $\xrightarrow{OH^-}$ 5 Δ -Androstandion-5,6-T) zu einer wesentlich geringeren HTO-Bildung (0,45 %), was beweist, daß Tritium aus der Position 4 des Steroidmoleküls enzymatisch als HTO entfernt wird.

Wegen der starken Geschlechtsabhängigkeit der Hydroxylierungsraten untersuchten wir den Einfluß des Antiandrogens Cyproteronacetat bei männlichen Ratten auf die Hydroxylierung des Androgens. (In einer Arbeit von Hoffmann und Breuer (26) wird über eine Hemmung der 21-Hydroxylase der Nebennierenrinde nach Gabe von Cyproteronacetat berichtet.)

Nach Gabe von 220 mg/kg und sogar noch nach Gabe von 6 mg/kg Cyproteronacetat bei gleichzeitiger Injektion des tritierten Steroids wird weniger HTO als im Kontrollversuch ermittelt (s. Abb. 10, Seite 61). Damit wird eine deutliche und, wie der folgende Versuch zeigt, auch selektive Einschränkung der Hydroxylase-Tätigkeit erreicht. Denn wenn männlichen Ratten bei gleichzeitiger Vorbehandlung statt Androstandion

tritiertes Östradiol injiziert wird, kann eine Einschränkung der Hydroxylase-Tätigkeit am Östradiol-Molekül nicht nachgewiesen werden.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Die Coenzym-Spezifität von Dehydrogenasen innerhalb einer Zelle konnte bisher unter in-vivo Bedingungen nicht untersucht werden, so daß fast alle gegenwärtigen Kenntnisse über das Verhalten von Dehydrogenasen aus Arbeiten mit isolierten Enzymen stammen. Mit Hilfe von in spezifischer Position mit Tritium markierten Substraten gelang es, Untersuchungen an bestimmten Dehydrogenasen in Gegenwart aller im Lebergewebe enthaltenen Enzyme und Coenzyme - also unter angenäherten in-vivo Bedingungen - durchzuführen.

So wurden oxydierbare tritierte Zellsubstrate mit Leberhomogenat kurzzeitig inkubiert und die enzymatisch tritierten Pyridinnucleotide nach Trennung über eine Austauschersäule auf ihren Radioaktivitätsgehalt untersucht. Aus der Tritium-Verteilung sind Rückschlüsse auf die in der Zelle vorliegende Coenzym-Spezifität der die Oxydation katalysierenden Dehydrogenase möglich.

Von Interesse war der Vergleich mit den aus oben beschriebenen Methoden bekannten Ergebnissen. Bei der Lactat-Dehydrogenase ergab sich keine Abweichung gegenüber ihrem Verhalten bei in-vitro Versuchen, während die Alkohol-Dehydrogenase unter den von uns verwendeten Bedingungen eine größere NADP-Spezifität und somit als NADPH-Lieferant

eine größere Bedeutung bei reduktiven Biosynthesen besitzt. Glutamat-2-T wird in Leberhomogenat NADP-spezifisch oxydiert, was deshalb interessant ist, da isolierte Glutamat-Dehydrogenase auch mit NAD reagieren kann. Durch Inkubation von Isocitrat-2-T mit Rattenleberhomogenat konnte erstmals festgestellt werden, daß dieses Substrat etwa 3 mal schneller über die NADP-spezifischen Enzymkomplexe als über die um das Substrat konkurrierende NAD-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase verstoffwechselt wird.

Von Bedeutung für die weiteren Untersuchungen war das Verhalten der Hydroxysteroid-Dehydrogenasen gegenüber den beiden Pyridinnucleotiden NAD und NADP. Durch enzymatische Oxydation C_3 -, C_{17} - und C_{20} -markierter Steroide konnte unter Anwendung der oben beschriebenen Methode die 3 β -, 17 β - und 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase auf ihre Coenzym-Spezifität untersucht werden.

Nach diesen Ergebnissen reagiert die 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase im Gegensatz zu den bisher bekannten Untersuchungen ausschließlich NADP-spezifisch. Bei der 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase konnte eine Affinität des Enzyms nur zu einem Coenzym, nämlich NADP, nachgewiesen werden. In der Literatur war teilweise ein NAD-spezifisches Verhalten diskutiert worden.

Aus der Reihe der untersuchten Steroid-Dehydrogenasen reagierte nach unseren Ergebnissen nur die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase mit beiden Coenzymen, wobei auf das NAD etwa 2 mal mehr Wasserstoff übergeht. Die Voraussetzung für eine Transhydrogenase-Funktion (doppelte Coenzym-Spezifität) wird damit nur durch die 17 β -Hydroxysteroid-

Dehydrogenase erfüllt, der damit eine wichtige Verteilerfunktion im Wasserstoff-Haushalt (NAD-Atmungskette/NADP-Biosynthese) des externen Raumes der Zelle zukommen kann.

Bei Untersuchungen des Wasserstoff-Transfers über Pyridinnucleotide auf Steroide konnte eine von Wenzel et al. beschriebene bevorzugte Wasserstoff-Übertragung von Östradiol auf Androstendion (Wasserstoff-Transfer von C_{17} auf C_{17}) auf andere biologisch interessante Positionen des Steroidmoleküls (C_3 , C_{20} und Δ_4) nur in geringem Ausmaß beobachtet werden. Dieses Ergebnis macht eine besondere Bedeutung von Redoxvorgängen an C_{17} von Steroidhormonen deswegen wahrscheinlich, da östrogene bzw. androgene Wirkung entscheidend an das Vorhandensein einer Sauerstoff-Funktion an C_{17} gebunden ist.

Als Voraussetzung für einen optimalen Tritium- und damit Wasserstoff-Transfer innerhalb der Steroide wurde erkannt:

- a) schnelle Metabolisierung des tritierten Substrates
- b) etwa gleiche Umsatzgeschwindigkeit des Wasserstoff-liefernden - also Donator-Systems und des Wasserstoff-verbrauchenden- also Akzeptor-Systems.

Offensichtlich treffen diese Bedingungen innerhalb der Steroide nur für einen durch die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase katalysierten Wasserstoff-Transfer zu, wobei möglicherweise das Wasserstoff-liefernde und Wasserstoff-aufnehmende Substrat durch dasselbe Enzym umgesetzt werden kann.

Im Rahmen der Diskussion über den Wasserstoff-Transport zwischen Steroiden wurde auch mit 5 α -Androstandion-4,5,6-T gearbeitet. Ein Wasserstoff-Transfer

durch Dehydrierung zu Δ_4 -Androstendion konnte dabei nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich aber unter in-vivo und in-vitro Bedingungen eine starke Hydroxylierung des Steroidmoleküls an C₄. Diese Hydroxylierung ist in männlichen Tieren etwa 10 mal stärker als in weiblichen Ratten. Interessanterweise konnte in weiteren Untersuchungen durch gleichzeitige Gabe des Antiandrogens Cyproteronacetat die Hydroxylierungsrate etwa um den Faktor 4 gesenkt werden. Cyproteronacetat hatte dagegen keinen Einfluß auf die Hydroxylierung des Östradiols. In einer vergleichenden Untersuchung konnte gezeigt werden, daß durch diese enzymatische Hydroxylierung das Tritiumatom in Position 4 des Androstandions labilisiert wird.

In Zusammenhang mit der Wasserstoff-Übertragung innerhalb der Steroide wurden 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T, 20 β -Hydroxy-progesteron-20 α -T und 5 α -Dihydrotestosteron-4,5,6-T synthetisiert.

L I T E R A T U R

1. Mc Lean, P.: Biochim. Biophys. Acta 30 , 316 (1958)
2. Talalay, P. und H.G. Williams-Ashman: Proc. nat. Acad. Sci. USA 44 , 15 (1958)
3. Westheimer, F.; H. Fischer, E. Conn und B. Vennesland: J. Amer. chem. Soc. 73 , 2403 (1951)
4. Klingenberg, M.: 11. Colloquium d. Ges. f. Physiol. Chemie Moosbach 1960
5. "The Enzymes" Vol. 7 (A) , Academic Press, New York a. London 1963
6. Hoppe Seyler/Thierfelder: VI/A , Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg 1964
7. Vennesland, B.: Federat. Proc. 17 , 1150 (1958)
8. Hess, B. und K. Brand: Z. f. analyt. Chemie 201, 125 (1964)
9. Mehles, A.H.; A. Kornberg et al.: J. B. C. 174, 916 (1948)
10. Meister, A.: J. B. C. 184 , 117 (1950)
11. Pullman, M.E.; S.P. Colowick and N.O. Kaplan: J. B. C. 194 , 593 (1952)
12. Bässler, K.H. in Hoppe Seyler/Thierfelder VI/A S. 638 Berlin, Göttingen, Heidelberg 1964
14. Otani, T.; T. Higashi und E. Maruyama: J. of Biochem. 58 , 47 (1965)
15. Vignais, P. et al.: Biochim. Biophys. Acta 47 , 515 (1961)
16. Kaplan, N.O. et al.: Proc. nat. Acad. Sci. USA 42, 418 (1956)
17. Breuer, H.: in Hoppe Seyler/Thierfelder VI/A S. 432 Springer Verlag, Berlin/Gött./Heidelbg. 1964

18. Tomkins, G.M.: J.B.C. 235 , 3112 (1960)
19. Dam, K. van und H.F. ter Welle in "Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria (Herausgeber: J.M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello und E.C. Slater) Elsevier, Amsterdam 7 , 235 (1966)
20. Chuampu, L. und L. Esuster: Europ. J. Biochem. 3 , 385 (1968)
21. Plaut, G.W.E. in "The Enzymes"; Vol. 7 (A), Academic Press New York and London 1963
22. Langer, L.J. und L.L. Engel: J.B.C. 233 , 583 (1958)
23. Langer, L.J.; E. Alexander und L.L. Engel: J.B.C. 234 , 2609 (1959)
24. Recknagel, R.O.: J.B.C. 227 , 273 (1957)
25. Hübner, H.J.; H. Staib: "Biochemie der Nebennierenrinden-Hormone" S. 91; Verl. G. Thieme, Stuttgart (1965)
26. Bersens, O. und I. Björkhem: Europ. J. Biochem. 2 , 503 (1967)
27. Klingenberg, M.; W. Slencka: Biochem. Z. 331 , 486 (1959)
28. Wenzel, M.; K. Pollow und T. Ziebarth: Z. Naturforschung 22 b , 894 (1967)
29. Wenzel, M. : Biochim. Biophys. Acta 152 , 431 (1968)
30. Wenzel, M.; M. Langold und P. Hallac: J.B.C. 244 , 4523 (1969)
31. Fieser, L.: J. Amer. Chem. Soc. 76 , 1945 (1954)
32. Campbell, J.: J. Amer. Chem. Soc. 80 , 4717 (1958)
33. Allen, W. und S. Bernstein: J. Amer. Chem. Soc. 76 , 6116 (1954)
34. Wenzel, M.; H. Wollenberg und P.E. Schulze: Atompraxis
" 7 , 89 (1961)
35. Shoppee, C.W.; D.B. Agashae und G.H.R. Summers: J. Chem. Soc.
3017 (1957)
36. Yusuf J. Abul-Hajj: J. of labelled Comp. 7 , 33 (1971)

37. Neuhoff, V.: Naunyn-Schmiedeb. Arch. exp. Path. und Pharmacol.
250 , 302 (1965)
38. "Biochem. Preparations"; Vol. 11 S. 92 (1966)
39. Pace, N. und E. Rathbun: J.B.C. 158 , 667 (1945)
40. Wenzel, M. und P.E. Schulze: "Tritium-Markierung", Verlag
Walter de Gruyter, Berlin 1962
41. Stahl, E.: "Dünnschicht-Chromatographie", Springer Ver-
lag 1969
42. Bergmeyer, H.U.: "Methoden der enzymatischen Analyse"
Verlag Chemie 1970
43. Wenzel, M.: Acta endocrinologica (im Druck)
44. Wenzel, M. und W. Mützel: Z.physiol.Chemie 351, 1221 (1970)
45. Hübner, H.J. und H. Staib: "Biochemie der NNR-Hormone"
S. 77 , Verlag G.Thieme, Stuttgart 1965
46. entfällt
47. Schriefers, H.: "Vitamins and Hormons" S. 271 (1968)
48. Hoppe Seyler/Thierfelder: "Handbuch d.Physiol.u.Path.
Chem.Analyse", Springer Verlag 1964 S. 500 Bd.6
49. Rongone, E.: Arch.of Biochem. and Biophys. 98, 292 (1962)
50. Mützel, W. : Dissertation 1970, Freie Universität Berlin
51. Wenzel, M.; H.Kleucker und P.E.Schulze: Z.f.Naturforschg.
Band 21 , 1178 (1968)
52. Wenzel, M.; L.Pitzel und P.E.Schulze: Z.f.physiol. Chemie
350 , 341 (1969)
53. Hieronimus, B.: Dissertation 1971, Freie Universität Berl.

M E T H O D I K

A. RADIOCHEMISCH - PRÄPARATIVER TEIL

=====

1. Synthese von 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T

siehe Formelschema M₂

Darstellung des 17,17-Äthylendioxy-5 α -androstan-3 β -ol
(B₁) aus 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on (A₁)

eingesetzte Mengen: 794,3 mg 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on

4,5 ml Äthylenglycol

30 mg p-Toluolsulfonsäure-Mono-
hydrat

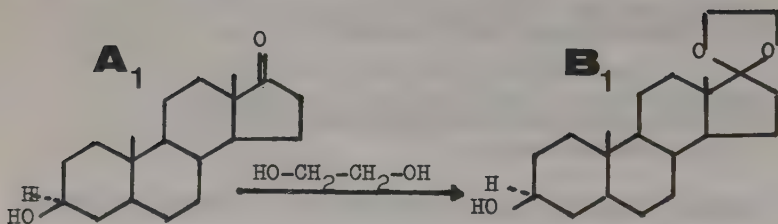
40 ml Benzol

Die Substanzen wurden im angegebenen Mengenverhältnis in einen 150 ml Kolben mit Magnetrührer gebracht und im Glycerinbad unter kräftigem Rühren bis zur Beendigung der Wasserbildung (7 Stunden) erhitzt (31,32).

Der gewöhnliche Phasentrenner von E. Dean und D. Stark wurde zur Erhöhung des Trenneffektes durch Einbau eines kleinen langstieligen Trichters und einer Kühlschlange in den Wasserfänger entscheidend verbessert. Vor Inbetriebnahme wird der Wasserfänger mit reinem Benzol - etwa 100 ml - gefüllt. Der kondensierte Dampf des Azeotrops Benzol -/Wasser tropft aus dem Kühler über den Trichter in die tiefen, gut gekühlten Schichten des Wasserfängers und entmischt sich. Die organischen Phasen fließen über ein Abflußrohr dem Kolben wieder zu. Der Kolbeninhalt wird

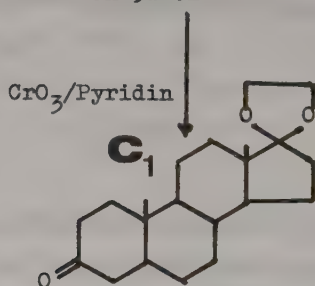
Synthese des 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T

=====

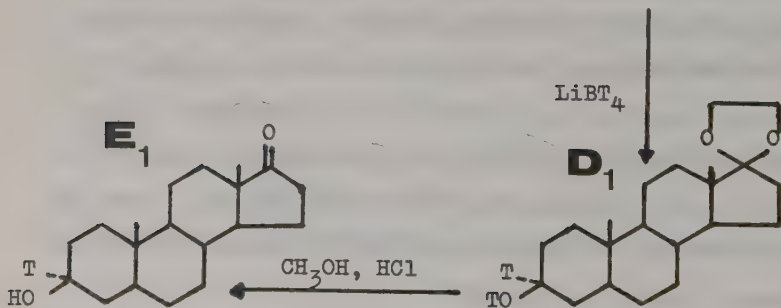


5 α -Androstan-3 β -ol-17-on

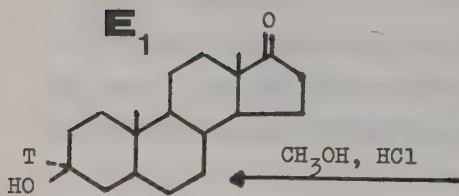
17,17-Äthylendioxy-5 α -androstan-3 β -ol



17,17-Äthylendioxy-5 α -androstan-3-on



17,17-Äthylendioxy-5 α -androstan-3 β -ol-3 α -T



5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T

nach Ende der Reaktion in einen 250 ml Scheidetrichter überführt, mit 5%-iger Natriumbicarbonat-Lösung, anschließend mit dest. Wasser gewaschen. Die Benzol-Phase wird über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, durch eine Fritte filtriert und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die sich bildenden weißen Kristalle werden 3 mal in Essigester umkristallisiert und anschließend getrocknet.

Ausbeute: 656 mg = 72 % der Theorie

Das Auftragen einer Probe des Zwischenproduktes auf zwei mit Kieselgel beschichtete DC-Fertigplatten und Entwickeln in den Fließmittelsystemen Chloroform/Aceton 9:1 und Cyclohexan/Essigester 6:4 ergab in beiden Fällen nach Besprühen mit äthanolischer Schwefelsäure (1:1) nur einen Fleck.

Schmelzpunkt: 150 - 152°C Lit. : 149 - 151°C

C_{gef.} : 75,58 % C_{Theor.}: 75,4 %

H_{gef.} : 10,17 % H_{Theor.}: 10,21 %

Das IR-Spektrum zeigt keine C=O-charakteristische Absorptionsfrequenz mehr.

Oxydation des 17,17-Äthylendioxy-5 α -androstan-3 β -ol (B₁) zu 17,17-Äthylendioxy-5 α -androstan-3-on (C₁)

Der Chromtrioxyd/Pyridin-Komplex läßt sich nach Delen und Bernstein (33) durch langsame Zugabe von 150 mg Chromtrioxyd in wasserfreies Pyridin herstellen. Die Temperatur sollte dabei 30°C nicht überschreiten.

eingesetzte Mengen: 250 mg 17,17-Äthylendioxy-5 α -androstan-
3 β -ol (B₁)
20 ml wasserfreies Pyridin
300 mg Chromtrioxyd, gelöst in
30 ml wasserfreiem Pyridin

In einem 100 ml Schliffkölbchen werden 250 mg Äthylenketal (B₁) in 20 ml wasserfreiem Pyridin gelöst, anschließend erfolgt die Zugabe der Chromtrioxyd/Pyridin-Suspension. Das Kölbchen wird nun verschlossen und nach mehrmaligem Umschütteln bei Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen. In einem mit 100 ml dest. Wasser gefüllten Schütteltrichter wird der Kolbeninhalt 3 mal mit Essigester extrahiert, die vereinigten organischen Phasen neutral gewaschen, getrocknet, filtriert und im Rotationsverdampfer eingengt. Die ausfallenden Kristalle werden 3 mal in Äthanol umkristallisiert. Nach jeder Umkristallisation wurde die Reinheit der Substanz dünnschichtchromatographisch überprüft (s.oben).

Ausbeute : 197 mg = 79,3 % der Theorie

Schmelzpunkt: 184°C Lit. : 182 - 184°C

C_{gef.} : 76,0 % C_{Theor.} : 76,0 %

H_{gef.} : 9,9 % H_{Theor.} : 9,6 %

Reduktion des 17,17-Äthylendioxy-5 α -androstan-3-on (C₁) zu 17,17-Äthylendioxy-5 α -androstan-3 β -ol-3-³H (D₁) durch LiBT₄

Das Lithiumborhydrid wurde von der Firma Radiochemical Centre Amersham (England) mit einer spezifischen Aktivität von 3,7 Ci/mMol bezogen.

eingesetzte Mengen: 1,2 mg 17,17-Äthylendioxy-5 α -androstan-3-on (C₁)

0,44 mg LiBT₄ = 75 mCi, suspensiert
in

3,0 ml Tetrahydrofuran absolut

Das abgewogene Ketal (C₁) wird in einem 25 ml Kölbchen mit 3,0 ml abs. Tetrahydrofuran, welches das radioaktive Reduktionsmittel enthält, versetzt und unter kräftigem Rühren (Magnetrührer) zunächst 3 Stunden bei Zimmertemperatur reduziert. Mit einer feinen Kapillare wird eine Probe von 0,01 ml = 0,4 γ aus dem Reaktionsansatz entnommen, auf eine Dünnschicht-Platte aufgetragen und im Fließmittelsystem Chloroform/Aceton 9:1 chromatographiert. Mit dem Dünnschicht-Scanner der Fa. Berthold wird die Aktivitätsverteilung bestimmt und das radioaktive Maximum mit einer mitentwickelten, inaktiven Vergleichssubstanz verglichen. Weiteres Kochen unter Rückfluß (45 Minuten) führte zu keiner nennenswerten Umsatzsteigerung. Die durch inaktive Vorversuche gewonnenen Reaktionszeiten erwiesen sich meist als zu kurz, deshalb war eine Kontrolle der ablaufenden Reaktion durch kontinuierliche Probenentnahme unerläßlich.

Verseifung des 17,17-Äthylendioxy-5 α -androstan-3 β -ol-3 α -T (D₁)
zu 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T (E₁)

Das Reaktionsgemisch wird, um überschüssiges Reduktionsmittel zu zerstören, mit 3 ml Methanol versetzt, anschließend wird bis zur sauren Reaktion gegenüber Lackmuspapier Salzsäure zugegeben. Nach 45 Minuten Kochen am Rückfluß ist das

Steroidketal (D_1) vollständig verseift. Die Verseifungsgeschwindigkeit wurde wiederum durch Probenentnahme und anschließende Dünnschicht-Chromatographie verfolgt.

Aufarbeitung und Reinigung des 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T (E_1)

Durch Destillation werden alle organischen Lösungsmittel entfernt. Das übergehende Destillat enthält bereits einen großen Teil an labilem Tritium. Die zurückbleibende wässrige Phase wird in einem 50 ml Scheidetrichter 4 mal mit 5 ml Essigester ausgeschüttelt, die vereinigten organischen Phasen mit dest. Wasser neutral gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Um letzte Reste an labilem Tritium zu entfernen werden nach dem Abschnorcheln des Lösungsmittels 2 mal 3 ml Methanol zugegeben und der gesamte Kolbeninhalt am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Anschließend werden 10 ml Benzol zugegeben.

Mit einem Test-Chromatogramm im Fließmittelsystem Äther/Dimethylformamid 99:1 entwickelt, konnte durch Messen der Aktivitätsverteilung mit dem Dünnschicht-Scanner keine radioaktive Verunreinigung des tritierten Steroidalkohols gegenüber der mitentwickelten, inaktiven Vergleichssubstanz nachgewiesen werden.

Um eine Trennung vom nicht reduzierten, inaktiven Steroidketon zu erreichen, war eine dünnschichtchromatographische Reinigung notwendig.

Die Technik der präparativen Dünnschicht-Chromatographie, das Auftragen, Entwickeln und Isolieren der getrennten Substanzen wurde bei

der Durchführung der inaktiven Vorversuche erarbeitet, ebenso wurden geeignete Fließ- und Eluationsmittel ermittelt.

Das aktive Material wurde auf wenige μ l eingeeengt und mit einer Kapillare auf die Dünnschicht-Platte (DC-Fertigplatten Kieselgel HF₂₅₄ der Fa. Merck, Darmstadt) aufgetragen und entwickelt. Die radioaktive Bande wurde mit dem Dünnschicht-Scanner lokalisiert, die betreffende Kieselgelzone abgeschabt und in einem Schliffkolben mehrmals mit Methylenchlorid extrahiert (Methylenchlorid hat sich als Extraktionsflüssigkeit gut bewährt, da der Anteil an löslichen Bestandteilen des Kieselgels relativ klein bleibt). Die gewonnenen Methylenchlorid-Auszüge wurden am Rotationsverdampfer eingeeengt und der Rückstand in Methanol/Benzol 2:1 (v/v) aufgenommen. Nachdem durch ein erneutes Test-Chromatogramm weder radioaktive noch inaktive Verunreinigungen festgestellt werden konnten, wurde die Lösung zur Aktivitätsbestimmung in ein 25 ml Meßkölbchen überführt. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte in einem Beckman Flüssig-Szintillationszähler Modell LS 150 (Ergebnisse s. M 9).
Ausbeute: 0,164 mg

Um den Reinheitsgrad der synthetisierten, radioaktiven Substanz zu überprüfen, wurde eine Probe mit 150 mg inaktivem 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on verdünnt und in verschiedenen Lösungsmitteln umkristallisiert.

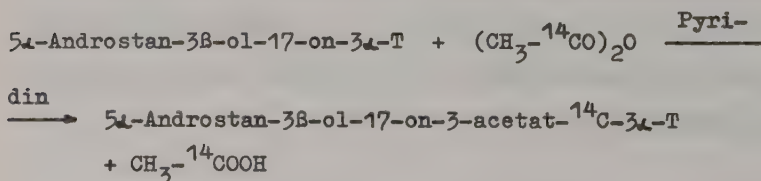
Ergebnisse der Umkristallisation:

	spezifische Aktivität		Lösungsmittel
1.	19 450	IpM/mg	Essigester
2.	19 050	IpM/mg	Essigester
3.	19 630	IpM/mg	Hexan
4.	19 100	IpM/mg	Hexan

Die spezifische Aktivität (IpM/mg) wurde nach jeder Umkristallisation neu bestimmt; sie blieb innerhalb der Fehlergrenze konstant. Das Präparat ist demnach radiochemisch rein.

Bestimmung der spezifischen Radioaktivität von 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T

Wegen der geringen Substanzmenge konnte das markierte Steroid nicht mehr verlässlich genau ausgewogen werden. Zur Mengenbestimmung und damit zur Messung der spezifischen Aktivität verwendeten wir deshalb die Methode der Doppelmarkierung. Dazu wird ^{14}C -markiertes Acetanhydrid mit bekannter spezifischer Aktivität ($\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$) mit dem tritierten Steroid umgesetzt.



Aufgrund der ^{14}C -Anteile im gebildeten Acetat ist eine Berechnung der μMol -Mengen möglich, so daß dadurch die

Bestimmung der spezifischen Aktivität von 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T (E₁)

a) Aktivitätsbestimmung mit dem Flüssig-Szintillationszähler der Fa. Beckman (LS 150)

N _O = 18 IpM					
N	N-N _O	Ext.Stand.	ZAB	ZpM	pCi
3 379 IpM	3 361 IpM	0,682	32,3 %	1,08 · 10 ⁴	4,68 · 10 ⁻³
Verdünnungsfaktor: 10 ⁵					
Gesamtaktivität : 468 pCi					
=====					

b) Die Ausbeuteberechnung und die Bestimmung der spezifischen Aktivität erfolgte durch Um-
setzung des tritiummarkierten Steroids mit ¹⁴C-Acetanhydrid (Doppelmarkierung). Bei dem
doppeltmarkierten Steroid-Acetat wurde folgende Aktivität gefunden:

$$\begin{aligned}
 &8,34 \cdot 10^{-2} \text{ pCi } ^3\text{H (Tritium)} ; \quad 2,51 \cdot 10^{-4} \text{ pCi } ^{14}\text{C} \\
 &===== \\
 &\text{spez. Aktivität des } ^{14}\text{C-Acetanhydrids: } 5 \text{ mCi/mMol} \longrightarrow 2,51 \cdot 10^{-4} \text{ pCi } ^{14}\text{C} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ pM} \\
 &8,34 \cdot 10^{-2} \text{ pCi } ^3\text{H} = 10^{-4} \text{ pMole}
 \end{aligned}$$

Gesamtausbeute: 0,164 mg
=====

spez. Aktivität: 834 pCi/pMol
=====

Gesamtausbeute berechnet werden kann.

Die Ermittlung der spezifischen Aktivität $\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$ 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T) ist für biochemische Umsetzungen von großer Bedeutung, da die Konzentrationen der tritierten Substrate möglichst im physiologischen Bereich eingesetzt werden sollen.

eingesetzte Mengen: 0,12 μCi 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T
in
0,2 ml wasserfreiem Pyridin
2 μCi ^{14}C -Acetanhydrid $\approx$ 0,0004 μMol
(spez. Akt. 5 mCi/ μMol) in
0,1 ml wasserfreiem Benzol

Der Ansatz wird 2 Stunden in einem Reagen glas mit Calciumchlorid-Röhrchen auf 80°C erhitzt. Anschließend wird der Inhalt mit 6 ml dest. Wasser verdünnt und in einem Schütteltrichter dreimal mit 2 ml Essigester extrahiert. Um letzte Reste von Pyridin aus der organischen Phase zu entfernen, wird diese bis zur sauren Reaktion gegenüber Lackmus-Papier mit verdünnter Salzsäure ausgeschüttelt und anschließend mit dest. Wasser neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und bis auf wenige μl abgeschnorchelt. Mit einer feinen Kapillare wird das Acetat auf eine Kieselgel-Platte aufgetragen und diese im Fließmittelsystem Cyclohexan/Essigester 6:4 entwickelt. Das Radioaktivitätsdiagramm ergab neben einer Startverunreinigung nur einen radioaktiven Peak, dessen Lage mit inaktivem 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3-acetat- ^{14}C -3 α -T identisch war. Nach dem Abschaben der radioaktiven Bande wurde in einer Glassäule mit

Essigester erschöpfend eluiert, anschließend das Eluat eingengt und der Rückstand erneut auf eine Kieselgel DC-Platte aufgetragen. Rechromatographiert wurde im Fließmittelsystem Chloroform/Aceton 9:1. Mit dem Dünnschicht-Scanner erhielten wir einen sauberen, einheitlichen Peak, dessen Lage identisch mit der inaktiven Vergleichssubstanz war. Die radioaktive Bande wurde erneut abgeschabt, eluiert und das Eluat am Rotationsverdampfer eingengt. Ein Teil davon wurde zur Ermittlung der Ausbeute und der spezifischen Aktivität direkt im Beckman Flüssig-Szintillationszähler gemessen (weitere Berechnung s. Seite M₉).

2. Synthese von 4-Pregnen-20 β -ol-3-on-20 α -T

siehe Formelschema M₁₂

Darstellung des 3,3-Äthylendioxy-5-pregnen-20 β -ol (B₂)
aus 4-Pregnen-20 β -ol-3-on (A₂)

eingesetzte Mengen: 640 mg 4-Pregnen-20 β -ol-3-on (A₂)

5,0 ml Äthylenglycol

30 mg p-Toluolsulfonsäure

40 ml Benzol

Arbeitsvorschrift s. M₁

Ausbeute: 531 mg $\approx$ 79,4 % der Theorie

Schmelzpunkt: 184 - 186°C Lit. : 182 - 185°C

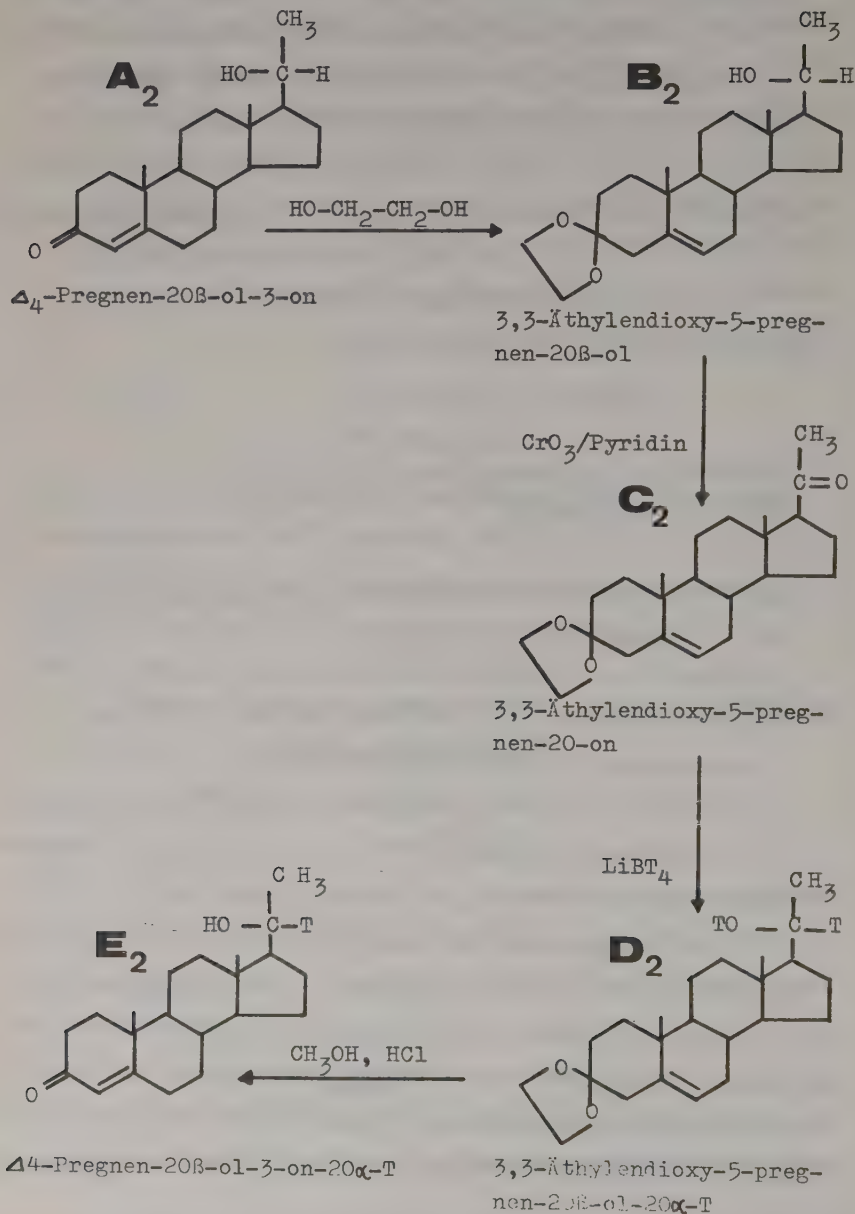
C_{gef.} : 76,9 % C_{Theor.}: 76,82 %

H_{gef.} : 10,35% H_{Theor.}: 10,0 %

Das IR-Spektrum zeigt nicht mehr die charakteristische Bande des Ausgangsproduktes bei 1650 cm⁻¹ (C=C konjugiert

Synthese des Δ_4 -Pregnen-20 β -ol-3-on-20 α -T

=====



mit C=O).

Oxydation des 3,3-Äthylendioxy-5-pregnen-20B-ol (B₂) zu 3,3-Äthylendioxy-5-pregnen-20-on (C₂) durch Chromoxyd / Pyridin

eingesetzte Mengen: 250 mg 3,3-Äthylendioxy-5-pregnen-20B-ol (B₂) in
20 ml wasserfreiem Pyridin
150 mg CrO₃ gelöst in
15 ml wasserfreiem Pyridin

Die Aufarbeitung des Reaktionsproduktes entspricht der Vorschrift auf Seite M₄.

Ausbeute: 203 mg $\hat{=}$ 80,5 % der Theorie

Schmelzpunkt: 169 - 173°C

C_{gef.} : 77,42 % C_{Theor.}: 77,23 %

H_{gef.} : 9,50 % H_{Theor.}: 9,51 %

Reduktion des 3,3-Äthylendioxy-5-pregnen-20-on (C₂) zu 3,3-Äthylendioxy-5-pregnen-20B-ol-20-T (D₂) durch LiBT₄

eingesetzte Mengen: 1,0 mg 3,3-Äthylendioxy-5-pregnen-20-on (C₂)

0,15 mg LiBT₄ $\hat{=}$ 25 mCi suspensiert
in

3,0 ml Tetrahydrofuran absolut

Entsprechend der Arbeitsvorschrift auf Seite M₅ wurden Testchromatogramme angefertigt, um so den Verlauf der Reduktion verfolgen zu können (5 Stunden bei 25°C, 45 Minuten am Rückfluß erhitzt). Die Verseifung des reduzierten

Ketals wurde nach der auf Seite M₅ angegebenen Vorschrift ausgeführt. Ein Dünnschicht-Chromatogramm, das im Fließmittelsystem Cyclohexan/Essigester 6:4 entwickelt wurde, zeigte erhebliche, nicht identifizierte radioaktive Verunreinigungen (Abb. 12). Der gesamte Ansatz mußte deshalb und um eine Trennung vom Ausgangsprodukt zu erreichen, 2 mal in Äther/Dimethylformamid 99:1 rechromatographiert werden.

Ausbeute: 0,062 mg

Eine anschließend durchgeführte radioaktive Verdünnungsanalyse führte nach mehrmaligem Umkristallisieren zu keiner Änderung der spezifischen Aktivität.

Ergebnisse der Umkristallisation:

spezifische Aktivität			Lösungsmittel
1.	1 030	IpM/mg	Essigester
2.	993	IpM/mg	Hexan
3.	1 015	IpM/mg	Essigester
4.	1 001	IpM/mg	Hexan

Bestimmung der spezifischen Aktivität von Δ_4 -Pregnen-20 β -ol-3-on-20 α -T (E₂)

a) Aktivitätsbestimmung mit dem Flüssig-Szintillationszähler LS 150 der Fa. Beckman

N _o = 18				
N	N-N _o	Ext. Stand.	ZAB	ZpM
276 IpM	258 IpM	0,684	32,4 %	
Verdünnungsfaktor: 10 ⁵				
Gesamtaktivität : 36 pCi				
				pCi
				3,6 · 10 ⁻⁴
				7,99 · 10 ²

b) Die Ausbeuteberechnung und die Bestimmung der spezifischen Aktivität erfolgte durch Um-
setzung des tritiummarkierten Steroids mit ¹⁴C-Acetanhydrid (Doppelmarkierung). Bei den
doppeltmarkierten Steroid-Acetat wurde folgende Aktivität gefunden:

$$1,52 \cdot 10^{-2} \text{ pCi T} \quad ; \quad 2,08 \cdot 10^{-4} \text{ pCi } ^{14}\text{C}$$

$$\text{spez. Aktivität des } ^{14}\text{C-Acetanhydrids: } 5 \text{ mCi/mMol} \longrightarrow 2,08 \cdot 10^{-4} \text{ pCi } ^{14}\text{C} = 0,83 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}$$
$$1,52 \cdot 10^{-2} \text{ pCi T} = 0,83 \cdot 10^{-4} \mu\text{Mole}$$

Gesamtausbeute: 0,062 mg spez. Aktivität: 185 pCi/μMol

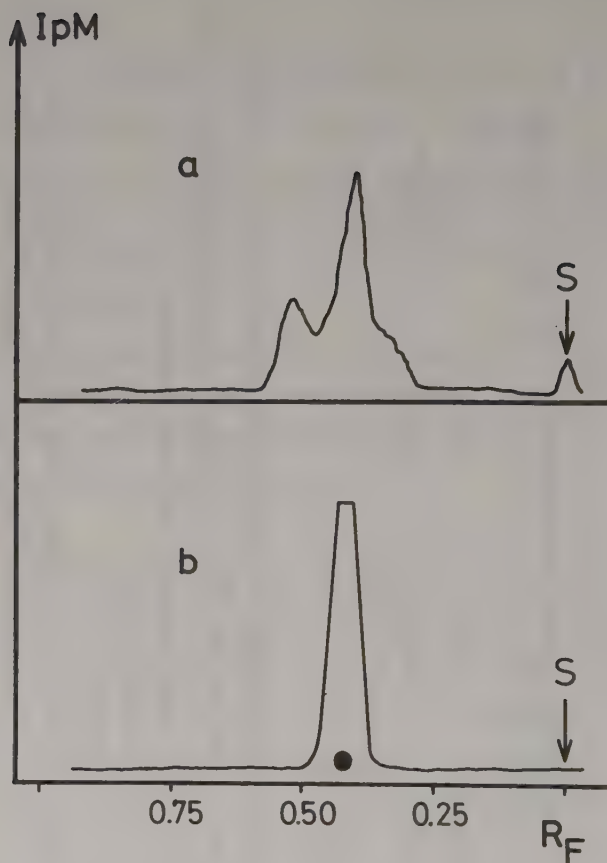


Abb. 12

=====

Radiochromatogramm des Δ_4 -Pregnen-20 β -ol-3-on-20 α -T

Laufmittelsystem: Äther/Dimethylformamid 99 : 1

a) vor chromatographischer Reinigung

b) nach chromatographischer Reinigung

3. Synthese von 5 α -Androstan-17 β -ol-3-on-4,5,6-T (5 α -Di-
hydrotestosteron-4,5,6-T)

Bestimmung der stöchiometrischen Verhältnisse bei der
katalytischen Reduktion von Testosteron mit Wasserstoff
(inaktiver Vorversuch)

Problemstellung: Ist Palladium(10%)-Kohle (Fa. Merck) der
geeignete Katalysator für die Hydrierung
der Doppelbindung von Testosteron; und
in welchem Ausmaß wird dabei die 3-Keto-
Gruppe reduziert?

eingesetzte Mengen: 125 mg Palladium(10%)-Kohle in
15 ml Äthanol suspensiert und mit
Wasserstoff gesättigt
129 mg Testosteron

Es wurde der Wasserstoff-Verbrauch in Abhängigkeit von
der Zeit gemessen.

Zeit (min)	Aufnahme von Wasserstoff (ml) bei einem Überdruck von 50 cm Wasser-Säule
0	0
2,0	4,2
5,0	9,3
15,0	9,6
18,0	9,6

Das entspricht einem Verbrauch von etwa 10,7 ml bei 20°C.

Theoretischer Verbrauch: $\frac{129}{288,4} \times 22,4 \times \frac{293}{273} = 10,72 \text{ ml}$

Ergebnis: Die Keto-Gruppe wird durch den Katalysator nicht angegriffen.

Aktiver Vorversuch mit ¹⁴C-markiertem Testosteron in der Tritier-Apparatur

Problemstellung : Wie groß ist das Verhältnis von 5 α - zu 5 β -Androstan-17 β -ol-3-on?

Sind beide Produkte dünnenschichtchromatographisch zu trennen?

eingesetzte Mengen: 2,5 μ Ci 4-¹⁴C-Testosteron
 15,0 mg Testosteron
 1,0 ml Katalysator-Suspension

Es wurden 2,5 μ Ci ¹⁴C-Testosteron mit 15 mg inaktiver Substanz, gelöst in 5,5 ml Äthanol, verdünnt. Das Lösungsmittel wurde anschließend am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand wurde dann mit 1 ml Katalysator-Suspension aufgenommen und mittels einer Pipette in den 2 ml fassenden Hydrierkolben überführt (die Katalysator-Suspension enthielt pro ml Äthanol 10 mg Katalysator). Es wurde mit 0,5 ml Äthanol nachgewaschen, dann das Kölbchen mit einem ca. 0,5 cm langen Magnetrührstäbchen versehen und an die Tritier-Apparatur gehängt. Der Inhalt des Kölbchens wurde mit flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend evakuiert. Durch eine Töpler-Pumpe wurde Wasserstoff aus dem Vorratsgefäß in das Hydrierkölbchen gepumpt. Die Hydrierung wurde bei einem Druck von 420 mm Hg begonnen. Nach 14 min. betrug

der Druckabfall 170 mm Hg, der sich nach weiteren 11 min. nicht veränderte.

Der Hydrieransatz wurde durch Watte filtriert und der Rückstand mit 8 ml Methanol nachgewaschen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und die Substanz in 3 ml Methanol aufgenommen. Ein Teil dieser Lösung wurde auf eine Dünnschicht-Platte aufgetragen und 3 Stunden im Fließmittelsystem Chloroform/Aceton 9:1 (v/v) entwickelt. Nur auf diese Weise war es möglich, 5 α -Androstan-17 β -ol-3-on von der 5 β -Verbindung zu trennen. Nach dem Ausmessen der radioaktiven Peaks zeigte es sich, daß die 5 β -Verbindung etwa 4 mal häufiger als das 5 α -Steroid entstanden war.

Reduktion der 4-Doppelbindung von Testosteron mit Tritiumgas
4 Ci Tritiumgas (trägerfrei) wurden aus einer Brechsigelampulle mittels der Töppler-Pumpe in das Vorratsgefäß der Tritier-Apparatur (34) gebracht.

eingesetzte Mengen: 13 mg Testosteron
 1 ml Katalysator-Suspension
 0,5 ml Äthanol

13 mg Testosteron wurden in 1,0 ml Katalysator-Suspension (10 mg Katalysator) und 0,5 ml Äthanol in dem 2 ml fassenden Hydrierkölbchen gelöst. Die weitere Prozedur ist identisch mit der des oben beschriebenen Vorversuchs. Nach 90 min. blieb der Druckabfall in der Apparatur konstant (p = 115 mm Hg).

Der Tritier-Ansatz wurde anschließend durch Watte filtriert und zur Entfernung von labil gebundenem Tritium dreimal mit

Bestimmung der spezifischen Aktivität von 5 α -Androstandion-4,5,6-T

a) Aktivitätsbestimmung mit dem Flüssig-Szintillationszähler LS 150 der Fa. Beckman

N _O = 20 IpM	N	N-N _O	Ext.Stand.	ZAB	ZpM	pCi
2 915 IpM	2 895 IpM		0,751	36,2 %	8,0·10 ³	3,6·10 ⁻³

Verdünnungsfaktor: 10⁷

Gesamtaktivität : 36 mCi
=====

b) Die Ausbeuteberechnung und die Bestimmung der spezifischen Aktivität erfolgte durch Um-
setzung des tritiummarkierten Steroids mit ¹⁴C-Acetanhydrid (Doppelmarkierung). Bei dem
doppeltmarkierten Steroid-Acetat wurde folgende Aktivität gefunden:

8,50·10⁻² pCi T ; 4,50·10⁻⁵ pCi ¹⁴C
=====

spez. Aktivität des ¹⁴C-Acetanhydrids: 5 mCi/mMol $\longrightarrow$ 4,5·10⁻⁵ pCi ¹⁴C = 1,8·10⁻⁵ μ M
8,5·10⁻² pCi T = 0,18·10⁻⁴ μ Mole

Gesamtausbeute: 2,21 mg
=====

spez. Aktivität: 4,73 Ci/mMol
=====

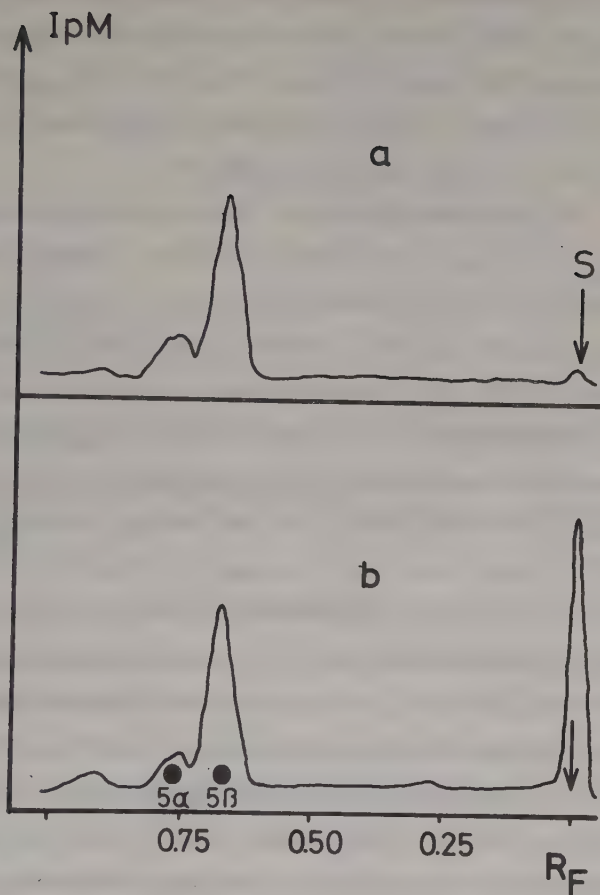


Abb. 13
=====

Radiochromatogramm des 5 α - und 5 β -Dihydrotestosterons-4,5,
6-T

Laufmittelsystem: Chloroform/Aceton 9 : 1 (3 Stunden
Durchlauf-Chromatographie)

a) Probenansatz unter Zugabe von 4-¹⁴C-Testosteron

b) Aliquot des mit Tritiumgas reduzierten Testosterons

je 15 ml Methanol verdünnt, die darauf am Rotationsverdampfer abdestilliert wurden. Der Rückstand wurde auf drei Dünnschicht-Platten aufgetragen (Kieselgel HF₂₅₄, Schichtdicke 0,75 mm) und 3 Stunden im Fließmittelsystem Chloroform / Aceton 9:1 (v/v) chromatographiert.

Mit dem Dünnschicht-Scanner wurde die Aktivitätsverteilung auf den Dünnschicht-Platten bestimmt, anschließend die 5 α -Androstan-17 β -ol-3-on-4,5,6-T-Banden vorsichtig abgeschabt und in einer Glassäule mit Essigester/Äthanol 1:1 erschöpfend eluiert. Ein Test-Chromatogramm zeigte noch eine geringe Verunreinigung von tritiummarkiertem 5 β -Androstan-17 β -ol-3-on, sodaß eine nochmalige dünnschichtchromatographische Reinigung notwendig wurde. Der auf wenige ml eingeeengte Rückstand wurde deshalb auf zwei Kieselgel-Platten (0,5 mm Schichtdicke) aufgetragen und wiederum 3 Stunden im Fließmittelsystem Chloroform/Aceton 9:1 chromatographiert. Nach dem erneuten Abschaben und Eluieren der radioaktiven Bande des 5 α -Androstan-17 β -ol-3-on-4,5,6-T konnte in einem weiteren Test-Chromatogramm keine Verunreinigung mehr nachgewiesen werden. Auch die anschließend ausgeführte radioaktive Verdünnungsanalyse zeigte nach mehrmaligem Umkristallisieren keine Änderung der spezifischen Aktivität.

Das Produkt war radiochemisch sauber.

Ausbeute: 2,21 mg

Nach Shoppee et al. (35) und Yusuf J. Abul-Hajj (36) verläuft die Hydrierung der Ring-A Doppelbindung des Testosterons nicht ohne Austauschreaktion in Position 6 des Steroid-Gerüsts ab. Durch Enolisierung (36) konnte bewiesen werden, daß nach Aufarbeitung des Ansatzes 67,5 % (Mittelwert aus

4 Bestimmungen) der Tritium-Aktivität im Steroidmolekül verblieben waren, der Rest (32,5 %) konnte als HTO bestimmt werden.

B. BIOCHEMISCHER TEIL

=====

1. Aufarbeitung und Trennung enzymatisch tritierter Pyridin- nucleotide nach Inkubation mit weiblichem Rattenleber- homogenat

Gewinnung des Rattenleberhomogenats

Die weiblichen Tiere wurden mit Chloroform narkotisiert und anschließend wurde die Leber entnommen. Das entblutete Organ wurde mit einer Schere zerkleinert und in einen Potter-Homogenisator gebracht. Anschließend wurde mit eiskaltem TRIS/HCl-Puffer pH = 7,4 so aufgefüllt, daß 1 ml der fertigen Leberhomogenat-Puffer-Suspension 300 mg Leber entspricht. Es wurde dann unter Eiskühlung bei 200 U/min. homogenisiert. Ein Aliquot des Homogenats wurde in den Inkubationsansatz gegeben und anschließend sofort bei 37°C in einer Schüttelapparatur 1 min. inkubiert.

Bereitung des Inkubationsansatzes für Pyridinnucleotid- Trennung

- 2 ml Leberhomogenat-Suspension $\hat{=}$ 600 mg weibl. Leber
- 1 ml TRIS/HCl-Puffer pH = 7,4

5	mg NAD	(MG = 663,4)	gelöst in 0,5 ml TRIS/HCl pH = 7,4
5	mg NADH	(MG = 665,4)	" " " "
5	mg NADP	(MG = 743,4)	" " " "
5	mg NADPH	(MG = 745,4)	" " " "

0,1 ml äthanolische (bzw. wässrige) Lösung des tritiierten Substrates.

Gesamtvolumen: 5,1 ml

Die folgenden radioaktiv markierten Substrate wurden als Reduktionsmittel für die Coenzyme eingesetzt:

Lactat-2-T	100	µCi/Ansatz
Glucose-1-T	100	µCi/ "
Isocitrat-2-T	25	µCi/ "
Glutaminsäure-2-T	100	µCi/ "
Äthanol-1-T	50	µCi/ "
Bernsteinsäure-2,3-T	25,5	µCi/ "
Östradiol-17 _α -T	29,4	µCi/ "
Methenolon-17 _α -T	32	µCi/ "
5 _α -Androstan-3 _β -ol-17-on-3 _α -T	15,6	µCi/ "
4-Pregnen-20 _β -ol-3-on-20 _α -T	9,8	µCi/ "
5 _α -Androstandion-4,5,6-T	11,2	µCi/ "

Die spezifischen Aktivitäten wurden durch Zugabe von inaktivem Material so gesenkt, daß die Endkonzentration zwischen 50-60 µMol/l lag.

Aufbereitung der Inkubationsansätze

Die Inkubationsansätze wurden in 30 ml einer Phenol-gesättigten, eiskalten Pufferlösung nach Neuhoff (37) aufgenommen und unter Eiskühlung 1 min. mit einem "Atomixmill" homogenisiert. Anschließend wurde nach Zugabe von 20 ml Chloroform bei 0°C 10 min. mit 5000 U/min. zentrifugiert und die Chloroform-Phase mit einem Scheidetrichter abgetrennt. Dieser Arbeitsgang wurde, um das Phenol zu entfernen, 3 mal wiederholt. Der klare, fluoreszierende wässrige Überstand wurde anschließend in ein Becherglas überführt, eingefroren und über Nacht gefriergetrocknet.

Aufbereitung der DEAE-Cellulose-Säule

DEAE-Cellulose (Fa. Macherey & Nagel, Düren) wurde solange in bidest. Wasser aufgeschlämmt, bis der wässrige Überstand nach etwa 15 min. keine Trübung mehr zeigte. Nach Abschlämen der Feinteile wurde portionsweise eine 30 x 1,5 cm lange Glassäule gefüllt. Anschließend wurde die Säule mit 250 ml einer 1 molaren Kaliumhydrogencarbonat-Lösung aktiviert, überschüssiges Hydrogencarbonat mit bidest. Wasser ausgewaschen (38).

Säulentrennung der Pyridinnucleotide

Der getrocknete Rückstand des Inkubationsansatzes - er enthält die markierten Pyridinnucleotide - wurde mit 2 ml bidest. Wasser aufgenommen und mit einer Pipette auf die Austauschersäule gebracht; anschließend wurde nochmals mit 0,5 ml bidest. Wasser nachgewaschen. Dann wurde mit einem ansteigenden Konzentrationsgradienten (350 ml bidest.

Wasser - 350 ml 0,4 molare Kaliumhydrogencarbonat-Lösung) über einem Fraktionssammler der Firma LKB eluiert. Die interessierenden, UV-absorbierenden Fraktionen wurden durch einen angeschlossenen UVICORD mit Schreiber markiert. Durch Entnahme von 0,5 ml Eluat pro Fraktion (Gesamtvolumen 5 ml) wurde nun die Aktivitätsverteilung im Flüssig-Szintillationszähler gemessen. Durch enzymatische Umsetzungen (optischer Test) wurde geprüft, ob die Maxima der Aktivitätsverteilung mit den UV-Maxima der Pyridinnucleotide übereinstimmen. Das Ergebnis eines derartigen Versuches ist in Abb. 1 dargestellt. Unter Abzug des Nullwertes wurde anschließend die Aktivitätsverteilung der NAD(H) / NADP(H)-Fraktionen ermittelt.

2. Inkubationsansätze für den Tritium-Transfer zwischen Substraten über Pyridinnucleotide

Gewinnung des Rattenleberhomogenats

siehe Seite M₂₁

Bereitung der Ansätze

Gesamtvolumen der Ansätze: 4,1 ml

1 ml Leberhomogenat-Suspension $\approx$ 200 mg Leber

3 ml TRIS/HCl-Puffer pH = 7,4

0,1 ml äthanolische Lösung; diese enthält die radioaktiven wie inaktiven Substrate.

Aufarbeitung der Inkubationsansätze für Steroid-Metaboliten Trennung

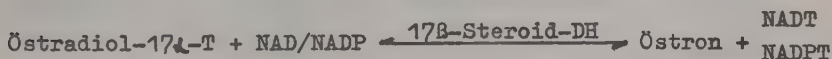
Die Reaktion wurde durch sofortige Zugabe von 4 ml Methylen-

chlorid gestoppt, der Inkubationsansatz zusammen mit dem Lösungsmittel in ein Zentrifugenglas überführt und anschließend 5 min. bei 5000 U/min. zentrifugiert. Das Methylenchlorid wurde dann mit einer Pipette vom Boden abgesaugt. Die Extraktion wurde 2 mal wiederholt. Die vereinigten organischen Phasen enthalten die interessierenden Steroid-Metabolite.

Das bei der Inkubation entstandene radioaktive Wasser (HTO) wurde durch Gefrierdestillation des wässrigen Inkubations-Überstandes gewonnen.

3. Radiospirometrie

Die Methode beruht auf einer stoffwechsellabilen Markierung der Substrate mit Tritium und einer Bestimmung des Umsatzes im Organismus durch Tritium-Aktivitätsmessung im Atemwasser nach z.B. folgender Gleichung:



————→ Atmungskette ———→ HTO ———→ homogene Verteilung
im Körperwasser

Versuchsanordnung:

Die Steroide wurden in 0,1 ml Äthanol gelöst und den Ratten intramuskulär injiziert. Je zwei Tiere werden danach in einen speziellen Kunststoffzylinder gesetzt, der mit getrockneter Luft durchströmt wird. Die in der Atemluft der Tiere enthaltene Feuchtigkeit wird in einer angeschlossenen Kühlfalle ausgefroren. Die Kühlfallen können beliebig oft

ausgewechselt werden. Aus den Wasserproben wird direkt die Tritiumaktivität in $\mu\text{Ci/ml}$ ermittelt.

Aus dem Körpergewicht des Tieres läßt sich das Gesamtkörperwasser (Kpw.) berechnen (39); es beträgt 68 % des Körpergewichtes. Kennt man die injizierte Aktivitätsmenge, so läßt sich der Umsatz des Steroids nach der folgenden Formel errechnen:

$$\% \text{ Oxydation} = \frac{\mu\text{Ci/ml Körperwasserdestillat}}{\mu\text{Ci/injiziertes Steroid/ml Kpw}} \times 100$$

C. PHYSIKALISCH-CHEMISCHE METHODEN

=====

1. Dünnschicht-Chromatographie und Messung der Radioaktivitätsverteilung auf Dünnschicht-Platten:

Die zur Trockne eingedampften Extrakte werden 3 mal mit 0,2 ml Äthanol aufgenommen und mit einer Blutzuckerpipette auf Dünnschicht-Platten (Kieselgel HF₂₅₄) der Firma Merck, Darmstadt, aufgetragen. Anschließend wurde in den angegebenen Fließmittelsystemen chromatographiert.

Die Lage der radioaktiven Steroide wurde durch Aktivitätsmessung mit dem Dünnschicht-Scanner II der Firma Berthold ermittelt (40). Inaktive Steroide, sowie aufgetragene Referenzsubstanzen wurden durch Ansprühen mit Anisaldehyd/Eisessig (29) angefärbt.

Bei quantitativen Bestimmungen wurde die Aktivitätsmenge mit Hilfe eines Integrationsschreibers ermittelt; dabei lagen die Zählausbeuten des Dünnschicht-Scanners bei einem Abstand von 1 mm (Oberfläche DC-Platte / Zählrohr) für Tritium bei 0,8% und für ^{14}C bei 25 %.

2. Flüssig-Szintillations-Meßtechnik

Zur Radioaktivitätsmessung von Lösungen wurde ein Flüssig-Szintillationszähler der Firma Beckman Instruments GmbH, Modell LS 150 benutzt. Für Tritium- und ^{14}C -Messungen wurden verschiedene Energie-Kanäle verwendet; die Zählausbeuten wurden durch die Kanalverhältnis-Methode mit einem externen Standard bestimmt. Die verwendete Szintillator-Lösung hatte folgende Zusammensetzung:

5 g 2,5-Diphenyloxazol

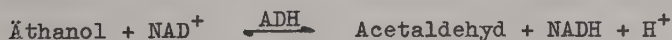
100 g Naphthalin

Dioxan ad 1 l.

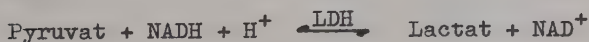
3. UV-Messungen mit dem Eppendorf-Photometer

Die Bestimmung der Pyridinnucleotid-Konzentrationen wurde bei 366 nm mit einem Eppendorf-Photometer bei 25°C durchgeführt. Den Untersuchungen lagen folgende Gleichungen zugrunde:

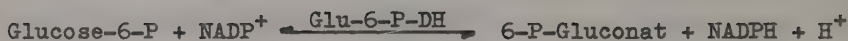
NAD:



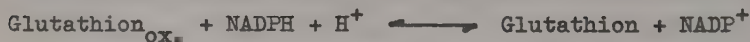
NADH:



NADP:



NADPH:



Die verwendeten Konzentrationen und Puffer waren der Literatur (42) entnommen.

4. Mikrochemische Methoden

Zur Identifizierung der Steroide wurden im Mikromaßstab folgende Reaktionen benutzt:

Reduktion : Die Steroide wurden in 1 ml Methanol gelöst und mit NaBH_4 in einem Eisbad 2 Stunden reduziert.

Oxydation : Die Steroide wurden in 1 ml Aceton gelöst und mit einigen Tropfen einer verdünnten, wässrigen $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ -Lösung oxydiert.

Acetylierung : Die Steroide wurden in 0,2 ml wasserfreiem Pyridin gelöst und mit 0,1 ml Acetanhydrid versetzt. Anschließend wurde 2 Stunden auf 80°C erwärmt.

Die erhaltenen Produkte wurden dünnschichtchromatographisch gereinigt und mit Hilfe von Referenzsubstanzen identifiziert.

D. MATERIAL

=====

Tiere: Männliche und weibliche Ratten entstammen eigener Zucht; sie waren etwa 150-250 g schwer.

Radioaktive Substanzen:

Die Herkunft und spezifischen Aktivitäten der verwendeten radioaktiven Präparate lauten:

Glucose-1-T	5	mCi/1,7 mg	NEN, Dreieichenhain
DL-Lactat-2-T	308	mCi/mM	NEN, " "
DL-Isocitrat-2-T	8,1	Ci/mM	NEN, " "
Bernsteinsäure-2,3-T	114,5	mCi/mM	NEN, " "
Äthanol-1-T	5	mCi/2,3 mg	NEN, " "
Lithiumborhydrid-T	3,7	Ci/mM	Radiochemical Ctr.
Acetanhydrid-1- ¹⁴ C	5	mCi/mM	NEN, Dreieichenhain
Glutaminsäure-2-T	3,05	Ci/mM	NEN, " "
Östradiol-17 α -T	2,5	Ci/mM	Radiochemical Ctr.
Östradiol-4- ¹⁴ C	54,4	mCi/mM	Radiochemical Ctr.
Progesteron-4- ¹⁴ C	58,5	mCi/mM	Radiochemical Ctr.
Methenolon-17 α -T	3,13	Ci/mM	eigene Herstellung
5 α -Androstan-3 β -ol-17-on-3 α -T	1,2	Ci/mM	" "
5 α -Androstandion-4,5,6-T	4,73	Ci/mM	" "
Pregnen-4-20 β -ol-3-on-20 α -T	185	mCi/mM	eigene Herstellung

Die für den optischen Test verwendeten Enzyme und Substrate stammen von der Firma Boehringer GmbH, Mannheim.

LEBENS LAUF

Am 17.6.1939 wurde ich als erster von drei Söhnen des Kaufmannes Karl Pitzel und seiner Ehefrau Gerda, geb. Ronneburg in Pernitz (Österreich) geboren.

Nach der 8 jährigen Grundschulzeit in Sangerhausen (Harz) besuchte ich am gleichen Ort die Geschwister-Scholl-Oberschule, an der ich im Mai 1957 das Abitur ablegte.

Das Chemie-Studium begann ich mit dem Sommersemester 1959 an der Universität in Saarbrücken. Nach der Vordiplom-Prüfung wechselte ich 1962 an die Freie Universität Berlin, wo ich im Sommersemester 1966 die Diplom-Prüfung bestand.

Meine Diplom-Arbeit fertigte ich am Physiologisch-chemischen Institut an. Im März 1968 wurde mir das Diplom zuerkannt.

